



**HAL**  
open science

# Etude des relations structure-fonction de la protéine ORF138 responsable de la stérilité mâle cytoplasmique

Ogura

Yann Duroc

► **To cite this version:**

Yann Duroc. Etude des relations structure-fonction de la protéine ORF138 responsable de la stérilité mâle cytoplasmique Ogura. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris 11, 2004. Français. NNT: . tel-02831069

**HAL Id: tel-02831069**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02831069>**

Submitted on 7 Jun 2020

**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.

N° D'ORDRE

-----

*UNIVERSITE DE PARIS-SUD  
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY*

THESE  
présentée  
pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS 11, ORSAY  
Discipline : Science du végétal

par

Yann DUROC

**ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTION  
DE LA PROTEINE ORF138 RESPONSABLE DE LA  
STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE OGURA.**

*Soutenue le 02 Décembre 2004*

Jury :

Mme Géraldine BONNARD  
M. Thierry GAUDE  
M. Stephen MANON  
Mme Emmanuelle MESTRIES  
M. Jean VIDAL  
Mme Françoise BUDAR

Rapporteur  
Rapporteur

Président  
Directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier Philippe Guerche pour m'avoir accueilli pendant ces 3 ans à la Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes de l'INRA de Versailles.*

*Je tiens également à remercier Françoise Budar pour m'avoir fait confiance pendant ces 4 ans à la station, pour m'avoir donné un sujet extrêmement passionnant dans l'univers de la CMS. Je voudrais également la remercier pour le temps, la disponibilité et l'énergie dont elle a pu faire preuve pendant cette thèse (surtout pendant ces 3 derniers mois), mais aussi de tout ce qu'il n'est pas possible d'écrire ici.*

*Il me tient à cœur également d'exprimer ici toute ma reconnaissance et ma profonde amitié à Sophie Hiard pour l'aide incommensurable, la bonne humeur et l'enthousiasme qu'elle a pu m'apporter tous les jours et qui fait de cette thèse ce qu'elle est aujourd'hui.*

*J'exprime également toute ma gratitude à Géraldine Bonnard, Emmanuelle Mestries, Thierry Gaude, Stephen Manon et Jean Vidal pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je n'oublie pas mes relecteurs préférés pour le temps qu'ils ont passé sur ce manuscrit : Sandrine pour ses commentaires toujours avisés et ces petits "smiley" qui rendent la relecture plus agréable, Hakim pour sa rigueur mais aussi pour ses discussions très stimulantes (et pas toujours sur les sciences) et Richard pour ses avis toujours très à propos et sa disponibilité. Merci également à Fabien et Christine dans leur petit bureau du 111 pour leur disponibilité de tous les jours.*

*Je tiens aussi à remercier Nicole et Catherine J. pour leur bonne humeur de tous les jours au 103. Un énorme merci à Alfred pour s'être occupé aussi bien de nos plantes et qui a l'art de faire reflourir plus de 10 fois les colzas en serre.*

*Je n'oublie pas Françoise Monéger et Jean Michel Camadro pour m'avoir soutenu et guidé lors des différents comités de thèse.*

*Un grand merci à Michaël G. et Sandrine T.Y. pour leur sérieux et leur implication dans le sujet lors des stages effectués au laboratoire.*

*Je n'oublie pas non plus David Day, pour ses conseils techniques et scientifiques tellement précieux et les anticorps anti-porine et anti-AOX. Je veux aussi remercier Michel Neuburger pour ses conseils et son aide sur les préparations et le fractionnement de mitochondries.*

*Un profond merci à Stéphanie et Valérie pour ces inoubliables journées du mercredi mais aussi pour leur soutien.*

*Merci également à l'escouade féminine des thésardes de la SGAP : Bénédicte, Hélène, Magalie et Stéphanie pour leur bonne humeur et leur soutien. Je n'oublie pas non plus Karen pour ses échanges si enrichissants lors de nos nombreuses discussions.*

*Merci aussi à tout le personnel de la station pour la bonne humeur et les discussions toujours animés qui donnent envie de travailler à la SGAP.*

*Je n'oublie pas Hiroshi Ogura qui a commencé une très belle histoire, un beau matin de février 1968 à l'Université de Kyusyu et qui n'est pas prête de s'achever.*

*Enfin et surtout, je dédie cette thèse à Céline qui a traversé cette thèse avec moi. Merci pour ta force, ton soutien et ta compréhension tout au long de ces 4 années. Un énorme bisou à ma petite Leïa qui a laissé travailler son papa et qui a eu beaucoup de patience pendant la rédaction de ce manuscrit.*

雨降って地固まる。

# ABBREVIATIONS – UNITES - NOMENCLATURE

## Termes français

ADN	: acide desoxyribonucléique	Hepes	: acide N-(hydroxyéthyl)pipérazine-N' -(2-éthanesulfonique)
ADN-T	: acide desoxyribonucléique transféré		
ADP	: adénosine diphosphate	IPTG	: isopropyl $\beta$ -D thiogalactopyranoside
AMP	: adénosine monophosphate	Kana	: Kanamycine
Ampi	: Ampicilline	KDO	: 2-kéto-3-déoxyoctonate
AOX	: alternative oxydase	LB	: Luria Bertani
APS	: persulfate d'ammonium	MCP	: mort cellulaire programmée
ARN	: acide ribonucléique	MDJ	: DnaJ mitochondriale
ARNt	: acide ribonucléique de transfert	MES	: acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique
ATP	: adénosine triphosphate		
BCP	: pourpre de bromocrésol	MGE	: GrpE mitochondriale
BET	: bromure d'ethidium	NAD <sup>+</sup>	: nicotinamide adénine dinucléotide
Bis-tris	: bis(2-hydroxyethyl)iminotris (hydroxymethyl)methane ; 2-bis (2-hydroxyethyl)amino-2 (hydroxymethyl)-1,3-propoanediol	NADH	: nicotinamide adénine dinucléotide réduit
BmT	: toxine de <i>Bipolaris maydis</i>	NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
BSA	: albumine de sérum bovin	NP-40	: nonidet P-40
CaMV	: virus de la mosaïque du choufleur	nPG	: n-propyl gallate
Cm	: Chloramphénicol	p/v	: poids par rapport au volume
cv	: cultivar	pH	: potentiel hydrogène
dAMP	: desoxyadénosine 5'-monophosphate	PMSF	: phénylméthylsulfonyl fluorure
dATP	: desoxyadénosine 5'-triphosphate	PmT	: toxine de <i>Phylosticta maydis</i>
dCTP	: desoxycytidine 5'-triphosphate	PVDF	: polyvinylidène fluorure
dGTP	: desoxyguanosine 5'-triphosphate	PVP	: polyvinylpyrrolidone
DMP	: diméthyl pimélimidate	ROS	: espèces réactives d'oxygène
DNase	: desoxyribonucléase	SDS	: sodium dodécylsulfate
dNTP	: desoxynucléotide 5'-triphosphate	SMC	: stérilité mâle cytoplasmique
DO	: densité optique	Temed	: N, N, N', N' tetraméthylène diamine
dTTP	: desoxythymine 5'-triphosphate	Tm	: température de dissociation
ECL	: électrochimiluminescence	Tris	: 2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3- propoanediol
EDTA	: acide éthylendiaminotétracétique	UV	: ultraviolet
EGTA	: acide éthylèneglycol-bis- ( $\beta$ -aminoéthylether) N,N,N',N'- tétracétique	v/v	: volume par rapport au volume
FADH <sub>2</sub>	: flavine adénine dinucléotide réduit	WS	: Wassilevskija
GMP	: guanine 5'-monophosphate	Xgal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D- galactopyranoside

## Termes anglais

APAF	: apoptosis protease activating factor	MS	: mass spectrometry
BLP	: Bcl2 like protein	MSF	: mitochondrial import stimulating factor
BN	: blue native	<i>orf</i>	: open reading frame
CAD	: caspase activated deoxyribonuclease	PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
CLP	: caspase like protein	PAM	: presequence translocase associated motor
DISC	: death inducing signaling complex	PARP	: poly (ADP ribose) polymerase
EST	: expressed sequence tag	PBF	: presequence binding factor
FAD	: flavin adenine dinucléotide	PCR	: polymerase chain reaction
FADD	: Fas associated death domain protein	PPR	: pentatricopeptide repeat
GFP	: green fluorescent protein	psi	: pression per inche
HCA	: hydrophobic cluster analysis	SAM	: sorting and assembly machinery
HR	: hypersensitive response	SC	: synthetic complete
HSP	: heat shock protein	TIM	: translocase inner membrane
IAP	: inhibitor of apoptosis	TNFR	: tumor necrosis factor receptor
IMP	: inner membrane peptidase	TOM	: translocase outer membrane
MAPK	: mitogen activated protein kinase	TRADD	: tumor necrosis factor receptor associated death domain
MIP	: mitochondrial intermediate peptidase		
MPP	: mitochondrial processing peptidase		
MPT	: mitochondrial permeability transition pore		

## UNITES

°C	: degré Celsius	mm	: millimètre
cm	: centimètre	mM	: millimolaire
cm <sup>2</sup>	: centimètre carré	ng	: nanogramme
g	: gramme	nm	: nanomètre
<i>g</i>	: unité de gravitation	pmol	: picomole
kb	: kilobase	rpm	: tours par minute
kDa	: kilodalton	U	: unité
kV	: kilovolt	V	: volt
L	: litre	µg	: microgramme
M	: molaire	µL	: microlitre
mA	: milliampère	µm	: micromètre
mL	: millilitre	µM	: micromolaire

## NOMENCLATURE :

Pour une question d'harmonisation, la nomenclature suivante a été adoptée : *gène* – PROTEINE

ORF138ΔX-Y : dénomme la protéine ORF138 où les résidus X à Y ont été supprimés

CxA : dénomme la substitution du résidu cystéine en un résidu alanine à la position x

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>I CARACTERISTIQUES DES MITOCHONDRIES</b>	<b>8</b>
1-/ <i>Le génome mitochondrial</i>	8
2-/ <i>Expression des gènes mitochondriaux</i>	12
2-1/ Transcription et contrôle post-transcriptionnel	12
2-2/ Edition	14
2-3/ Régulations post-traductionnelles	15
3-/ <i>Les mécanismes d'importation dans la mitochondrie de protéines codées par des gènes nucléaires</i>	16
3-1/ Caractéristiques des préséquences	16
3-2/ L'appareil d'importation	18
3-2-1/ Les translocases	18
3-2-1-1/ Les protéines TOM	19
3-2-1-2/ Les protéines TIM	21
3-2-2/ Les enzymes de maturation moléculaire	23
3-2-2-1/ La MPP	25
3-2-2-1/ Les IMP et MIP	25
3-2-3/ Les chaperones	26
3-2-3-1/ Les chaperones cytosoliques	26
3-2-3-1/ Les chaperones mitochondriales	26
4-/ <i>Le métabolisme mitochondrial</i>	27
4-1/ Généralités	27
4-2/ La chaîne respiratoire	29
4-3/ L'AOX	32
<b>II LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE ET LE ROLE DES MITOCHONDRIES</b>	<b>35</b>
1/ <i>Mort cellulaire programmée animale versus mort cellulaire programmée végétale</i>	35
2/ <i>Rôle de la mitochondrie et du cytochrome c</i>	38
3/ <i>Rôle des ROS et de l'oxyde nitrique dans la MCP</i>	39
<b>III LES STERILITES MALES CYTOPLASMIQUES</b>	<b>42</b>
1-/ <i>Utilisation de la SMC en production de semences hybrides</i>	42
2-/ <i>Gynodioécie naturelle</i>	44
3-/ <i>Les gènes de SMC</i>	45
4-/ <i>Exemples détaillés de quelques SMC</i>	48
4-1/ La SMC Texas chez le maïs	48
4-2/ La SMC IS112C chez le sorgho	51
4-3/ La SMC PET1 chez le tournesol	53
4-4/ La SMC G chez la betterave	55
<b>IV LA SMC OGURA</b>	<b>56</b>
1-/ <i>Mise en évidence de SMC Ogura chez Raphanus sativus</i>	56
2-/ <i>Transfert de la SMC Ogura dans la famille des Brassica cultivées</i>	56
2-1/ Création de lignées alloplasmiques de Brassica porteuses du cytoplasme Ogura	56
2-2/ Amélioration des lignées alloplasmiques par fusion de protoplastes	58
3-/ <i>Identification du gène responsable de la SMC Ogura</i>	59
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>61</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE I</b>	<b>65</b>
<b>ANALYSE DE LA SEQUENCE PRIMAIRE DE L'ORF138</b>	<b>65</b>
1/ <i>Introduction</i>	66
2/ <i>Construction d'un système pour tester les mutations de l'ORF138 chez E. coli</i>	70
3/ <i>Production et analyse des mutants aléatoires générés par PCR</i>	72
3/ <i>Mutations ponctuelles dirigées sur les codons Cys</i>	76
4/ <i>Mutations par délétions d'un domaine interne</i>	78

CHAPITRE II-----	83
LOCALISATION CELLULAIRE ET SUBMITOCHONDRIALE DE L'ORF138-----	83
1/ Localisation submitochondriale de l'ORF138 chez le colza -----	84
2/ Topologie de l'ORF138 dans la membrane -----	87
3/ Localisation de l'ORF138 dans les mitochondries de levure -----	89
4/ Localisation cellulaire chez <i>E. coli</i> -----	93
CHAPITRE III-----	98
ASSOCIATIONS MOLECULAIRES DE L'ORF138 -----	98
1/ Oligomérisation de l'ORF138 -----	99
2/ Identification d'un complexe de haut poids moléculaire contenant l'ORF138 -----	102
3-/ Etude de la liaison de l'ORF138 à des acides nucléiques-----	106
CHAPITRE IV -----	109
VERS UN ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'ORF138 ? -----	109
1-/ Résultats antécédents obtenus au laboratoire -----	110
1-1/ Tentatives de production de plantes mâle stériles par transgénèse-----	110
1-2/ observation de morphologies mitochondriales chez la levure. -----	111
2-/ L'expression de l'ORF138 dans les cellules tapétales d' <i>A. thaliana</i> provoque-t-elle une stérilité mâle ? -----	113
3-/ l'expression de l'ORF138 dans les cellules végétales conduit elle à des altérations de morphologie mitochondriale ? -----	114
3-1/ Transformation transitoire de cellules d'épiderme d'oignon -----	114
3-2/ Transformation stable d' <i>A. thaliana</i> -----	116
4-/ Peut-on identifier des effets de l'ORF138 sur le métabolisme mitochondrial ? -----	119
4-1/ ORF138 et stress oxydatif chez la levure -----	120
4-2/ Analyse du niveau d'expression et de l'activité AOX chez le colza-----	122
<b>DISCUSSION -----</b>	<b>126</b>
<i>Une approche biochimique permet-elle de réunir les éléments nécessaires à la compréhension du mécanisme ? -----</i>	<i>127</i>
<i>L'analyse de la séquence peut-elle donner des informations sur les caractéristiques structurales de l'ORF138 déterminantes pour son action ? -----</i>	<i>131</i>
<i>L'adressage de l'ORF138 vers les mitochondries à partir du cytoplasme peut-il être utilisé pour obtenir des indices quant à l'effet provoqué par sa présence ? -----</i>	<i>133</i>
<i>Peut-on identifier des effets physiologiques de l'ORF138 dans les systèmes d'études disponibles ?-----</i>	<i>139</i>
<b>CONCLUSION -----</b>	<b>145</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES -----</b>	<b>148</b>
1-/ <b>MATERIELS</b> -----	149
1-1/ Plantes-----	149
1-1-1/ Colza-----	149
1-1-1-1/ Conditions de culture en serre -----	149
1-1-1-2/ Conditions de culture des plantules étiolées -----	149
1-1-2/ <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	149
1-2/ Souches de bactéries -----	150
1-2-1/ <i>E. coli</i> -----	150
1-2-2/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -----	150
1-3/ Souches de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	150
1-4/ Plasmides -----	151
1-4-1/ Vecteurs de clonages -----	151
1-4-2/ Vecteurs d'expression bactérienne -----	151
1-4-3/ Vecteurs binaires -----	151
1-4-4/ Vecteurs d'expression de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	151
1-5/ Oligonucléotides -----	152
1-6/ Milieux de culture -----	152
2-/ <b>METHODES</b> -----	154
2-1/ Biologie moléculaire -----	154
2-1-1/ Extraction d'ADN-----	154
2-1-1-1/ Préparation d'ADN plasmidique de bactérie -----	154
2-1-1-2/ Préparation d'ADN génomique d' <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	154
2-1-2/ PCR mutagène-----	155
2-1-3/ Mutagenèse dirigée -----	155
2-1-4/ Electrophorèse d'ADN -----	156
2-1-5/ Clonage-----	156



2-1-5-2/ Purification de fragments d'ADN (sur gel d'agarose et PCR) -----	156
2-1-5-3/ Déphosphorylation des extrémités 5' -----	156
2-1-5-4/ Ligatures -----	157
2-1-5-5/ Transformation génétique de bactéries -----	157
2-1-5-5-1/ Electroporation d' <i>E. coli</i> DH10B et d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 pMP90 -----	157
2-1-5-5-2/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS -----	158
2-1-5-6/ Transformation génétique de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	158
2-1-6/ Séquençage -----	158
2-1-7/ Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	159
2-1-7-1/ Réalisation -----	159
2-1-7-2/ Sélection des transformants -----	159
2-1-8/ Expression transitoire par bombardement -----	160
2-1-9/ Analyses microscopiques -----	160
2-2/ Biochimie -----	161
2-2-1/ Manipulations résolutes -----	161
2-2-1-1/ Isolement de mitochondries -----	161
2-2-1-1-1/ Isolement de mitochondries d'hypocotyles étiolés de colza -----	161
2-2-1-1-2/ Isolement de mitochondries de boutons floraux de colza -----	162
2-2-1-1-3/ Isolement de mitochondries de levures -----	162
2-2-1-2/ Fractionnements mitochondriaux -----	163
2-2-1-2-1/ Fractionnements de mitochondries de colza et traitements à la protéinase K -----	163
2-2-1-2-2/ Fractionnement de mitochondries de levures -----	164
2-2-1-3/ Fractionnement et traitement de membranes -----	165
2-2-1-3-1/ Préparation de fractions solubles et insolubles d' <i>E. coli</i> -----	165
2-2-1-3-2/ Fractionnement de membranes d' <i>E. coli</i> -----	166
2-2-1-3-3/ Traitements alcalins des membranes -----	166
2-2-1-4/ Crosslink -----	167
2-2-1-4-1/ Crosslink au Diméthylpimélimidate (DMP) -----	167
2-2-1-4-2/ Crosslink au formaldéhyde et isolement de fractions nucléoprotéiques -----	167
2-2-2/ Manipulations analytiques -----	168
2-2-2-1/ Dosages protéiques -----	168
2-2-2-2/ Séparation en Blue Native-PAGE -----	169
2-2-2-2-1/ Préparation des échantillons -----	169
2-2-2-2-2/ Réalisation de la séparation -----	169
2-2-2-3/ Séparation SDS-PAGE -----	170
2-2-2-3-1/ Préparation des échantillons -----	170
2-2-2-3-2/ Réalisation de la séparation -----	170
2-2-2-4/ Coloration des protéines au bleu de coomassie -----	171
2-2-2-5/ Détection immunologique de protéines -----	171
2-2-2-5-1/ Electrotransfert -----	171
2-2-2-5-2/ Détection -----	173
2-2-2-6/ Activités enzymatiques et tests colorimétriques -----	175
2-2-2-6-1/ NADH oxydase -----	175
2-2-2-6-2/ NADH cytochrome c oxydoréductase -----	175
2-2-2-6-3/ Test KDO -----	175
2-2-2-7/ Mesures de respirations - électrode à oxygène -----	175
2-3/ Biologie cellulaire -----	176
2-3-1/ Courbes de croissance d' <i>E. coli</i> -----	176
2-3-2/ Test de viabilité des levures après traitement à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -----	176

**BIBLIOGRAPHIE ----- 177**

**ANNEXES ----- 196**

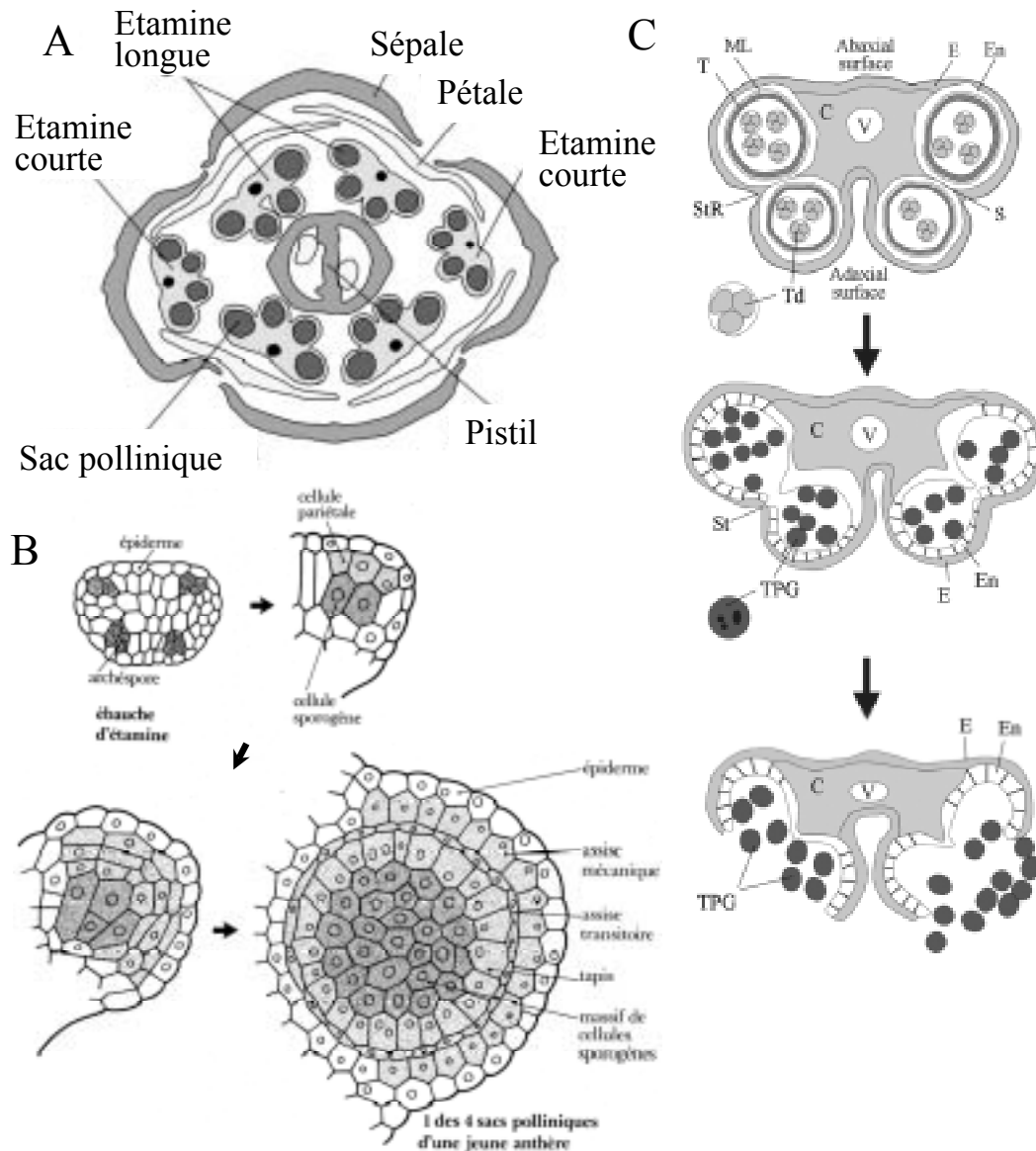
ANNEXE 1 -----	197
ANNEXE 2 -----	200
ANNEXE 3 -----	203
ANNEXE 4 -----	206
ANNEXE 5 -----	210
ANNEXE 6 -----	213
ANNEXE 7 -----	220

# INTRODUCTION

Chez les angiospermes (plantes à fleur ayant des ovules protégés par un ovaire qui donneront après fécondation des graines à l'intérieur d'un fruit), le grain de pollen (gamétophyte mâle) est produit par un organe spécialisé, l'anthere (figure 1). La formation du grain de pollen s'effectue à l'intérieur des tissus de la plante mère. Les archéspores donnent naissance aux cellules pariétales d'une part et aux cellules sporogènes d'autre part. Ces dernières se divisent pour constituer un ensemble de méiocytes. Les méiocytes subissent ensuite les deux divisions de la méiose, donnant chacun naissance à quatre microspores. La différenciation des microspores au sein de l'anthere aboutit à la formation des grains de pollen matures. Parallèlement à ces événements, les cellules pariétales se divisent par mitose formant ainsi plusieurs couches cellulaires. L'assise la plus proche des loges polliniques, le tapis, est un tissu composé de cellules sécrétrices permettant le bon développement du gamétophyte mâle. Cette assise cellulaire suit un développement dont le déroulement est étroitement synchronisé avec celui des microspores. De plus, de nombreuses observations sur la dégénérescence des cellules tapétales lors du développement normal de l'anthere a permis de penser que la disparition de cette assise est due à un programme de mort cellulaire. Les couches cellulaires les plus externes de l'anthere permettent la rupture des loges polliniques conduisant à la libération du pollen.

La stérilité mâle est un phénomène caractérisé par l'incapacité d'une plante à produire du pollen fonctionnel. Le déterminisme de la stérilité mâle peut être nucléaire ou cytoplasmique. Dans le cas de stérilités mâles à déterminisme nucléaire, la transmission du caractère est mendélienne et les allèles responsables sont en général récessifs. Dans le cas de stérilités mâles cytoplasmiques (SMC), le déterminant de la stérilité est mitochondrial et l'hérédité est donc entièrement maternelle. La stérilité mâle peut être contrecarrée par l'action de gènes nucléaires permettant de restaurer le phénotype mâle fertile. Ces gènes sont appelés gènes de restauration. La SMC présente donc un déterminisme nucléo-cytoplasmique plutôt que strictement cytoplasmique.

Un dysfonctionnement mitochondrial, dû à la présence de la protéine de stérilité, dans certaines assises cellulaires, notamment l'assise tapétale, est supposé être à l'origine de l'avortement du pollen. Parfois, la stérilité mâle est associée à un déclenchement prématuré de la mort cellulaire du tapis.



**Figure 1.** Développement de l'anthere

(A) Schéma d'une coupe transversale d'un bouton floral d'*Arabidopsis* montrant le nombre, la position et l'orientation des organes floraux

(B) Schéma de la mise en place des types cellulaires dans une jeune anthere.

(C) Schémas de coupe transversales d'anthere d'*Arabidopsis* à différents stades

C : connectif - E : épiderme - En : assise mécanique - ML : assise transitoire - S : septum  
 St : stomium - StR : région du stomium - T : tapis - Td : tétrades - TPG : grain de pollen.

D'après Scott et al. 2004

Dans cette introduction, j'ai donc choisi de présenter plus ou moins en détail le contexte biologique de ce travail, en insistant sur les informations qui me semblent être les plus pertinentes et qui, à mon sens, permettent d'apporter des éléments essentiels à la compréhension du manuscrit.

Dans une première partie, je vais donc décrire quelques caractéristiques des mitochondries, qui peuvent être conservées entre les eucaryotes ou bien spécifiques des mitochondries végétales.

Ensuite, dans la deuxième partie, je me suis attaché à décrire l'implication de la mitochondrie lors d'un programme de mort cellulaire.

La troisième partie permet de dresser une vue d'ensemble des SMC et des mécanismes connus ou supposés à ce jour.

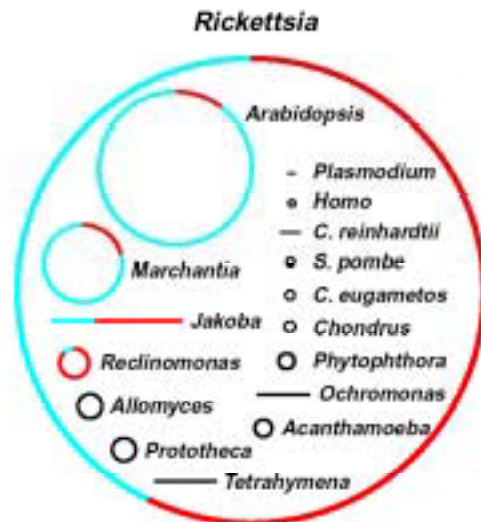
Enfin, j'ai entrepris de présenter les étapes importantes de l'étude de la SMC Ogura chez le colza qui ont précédé ce travail.

# I Caractéristiques des mitochondries

## 1-/ Le génome mitochondrial

Selon la théorie de l'endosymbiose, les cellules eucaryotes sont le résultat d'une intégration entre une archée (ou une lignée cellulaire issue de ce règne) et une  $\alpha$ -protéobactérie, à l'origine des mitochondries (Margulis 1970). Il existe donc une communauté d'origine chez les mitochondries de tous les eucaryotes. En effet, les génomes mitochondriaux tels qu'on peut les observer aujourd'hui sont le résultat de l'évolution du génome ancestral de l' $\alpha$ -protéobactérie adoptée par une cellule hôte. Les fonctions mitochondriales actuelles sont donc le fruit d'une coévolution entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire, les rendant dépendants l'un de l'autre. Cette évolution s'est traduite notamment par un transfert très important d'information génétique de la mitochondrie vers le noyau. En effet, environ 99% des gènes codant des protéines mitochondriales sont des gènes nucléaires. Chez *Arabidopsis thaliana*, par exemple, cela a conduit à un génome mitochondrial ne comportant plus que 57 gènes (Unsel et al. 1997).

Bien que l'ADN mitochondrial code pour un nombre de fonctions limitées mais très conservées, ce génome montre une très grande variation de structure, de taille (figure 2) mais aussi dans l'arrangement et l'expression des gènes (Cummings 1992). Comme les génomes bactériens typiques, beaucoup d'ADN mitochondriaux sont caractérisés en tant que molécules circulaires (Bendich 1993). Il existe cependant des génomes mitochondriaux linéaires (Coleman et al. 1991). La taille de ces génomes s'étend de 6 kilopaires de bases (kb) chez *Plasmodium falciparum* (le parasite responsable de la malaria) à plus de 2000 kb chez les plantes terrestres. L'ADN mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* par exemple possède une taille (367 kb) équivalente au tiers de la taille du génome de *Rickettsia prowazekii* (eubactérie probablement apparentée à l'alphaprotéobactérie ancestrale des mitochondries), pourtant il ne code que 32 protéines contre 834 chez la bactérie. Les mammifères et les eucaryotes inférieurs possèdent pour la plupart des génomes mitochondriaux compactés alors que ceux des plantes sont les plus expansés (Gray et al. 1999). Cette différence des tailles entre eucaryotes est due à la proportion extraordinairement élevée (80%) de séquences non codantes dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis* comparé au génome de *Rickettsia* (24%) (Andersson et al. 1998).



**Figure 2**

Représentation schématique des tailles des génomes mitochondriaux de certains organismes comparées à celle de l' $\alpha$ -protéobactérie *Rickettsia*.

Les cercles et les lignes représentent les génomes circulaires et linéaires des espèces décrites. Leurs tailles relatives sont respectées sur la figure. Les génomes d'angiospermes sont représentés par *Arabidopsis thaliana* et *Marchantia polymorpha*. Pour les génomes de plus de 60 kb, les proportions relatives des séquences codant des protéines de fonction identifiées sont indiquées en rouges et les proportions relatives des séquences non codantes ainsi que les *orf* non caractérisées sont en bleu.

*C. reinhardtii* = *Chlamydomonas reinhardtii*

*C. eugametos* = *Chlamydomonas eugametos*

*S. pombe* = *Schizosaccharomyces pombe*

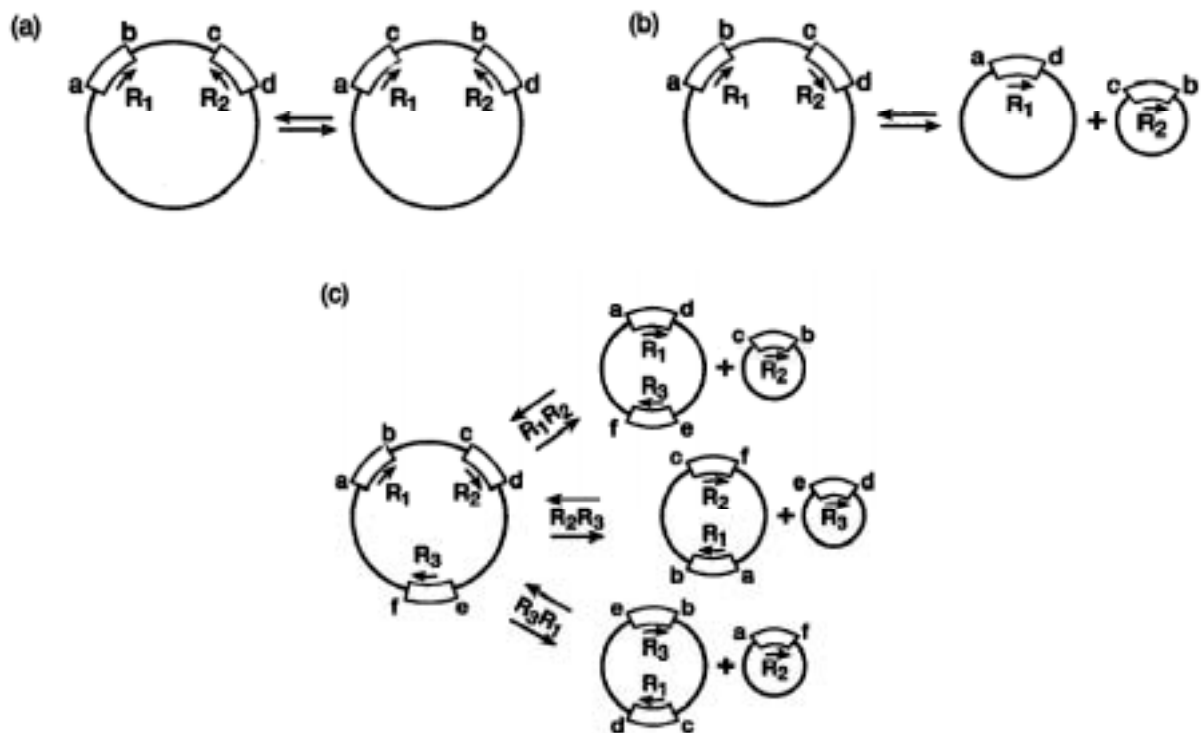
D'après Gray et al. 1999

Il est à noter que la structure et la taille du génome mitochondrial sont beaucoup plus variables dans le règne végétal que chez la grande majorité des eucaryotes (Wolstenholme et al. 1995) alors que le contenu en gènes reste globalement constant (Gray et al. 1999). Le séquençage du génome mitochondrial de *Marchantia polymorpha* (Oda et al. 1992), d'*Arabidopsis thaliana* (Unsel et al. 1997), de *Beta vulgaris* (Kubo et al. 2000) et de *Brassica napus* (Handa 2003) a permis de progresser dans la compréhension de cette variabilité. La variation de taille du génome est attribuable à trois facteurs :

- 1- l'existence de nombreuses séquences répétées,
- 2- l'intégration d'ADN exogène (des introns et des séquences d'ADN chloroplastique)
- 3- la capacité de changer de structure physique par de nombreuses recombinaisons entraînant des duplications (Small et al. 1987; Small et al. 1989).

La présence de séquences répétées hautement recombinogènes a été identifiée chez presque toutes les espèces analysées. Ces séquences représentent 6,7% du génome chez *A. thaliana*. Lorsque ces séquences répétées sont en orientation directe, elles permettent une subdivision du génome en plusieurs molécules subgénomiques (Small et al. 1987). Il existe également des recombinaisons intragéniques, mais elles sont moins fréquentes car les séquences répétées présentes dans les séquences codantes sont plus courtes et moins abondantes. Elles permettent néanmoins la création de nouvelles *orf* (Andre et al. 1992; Vedel et al. 1994) ainsi que le déplacement d'équilibres dynamiques. Ces nouvelles *orf*, si elles sont associées à la présence d'un promoteur efficace peuvent aboutir à l'expression de nouveaux gènes. Chez *A. thaliana* 8 *orf* chimériques de plus de 150 nucléotides présentant des fragments de gènes connus ont pu être identifiées (Marienfeld et al. 1997; Unsel et al. 1997). Ces phénomènes augmentent la complexité du génome mitochondrial des végétaux (figure 3). L'avantage sélectif conféré par ces recombinaisons, donnant lieu à des remaniements non négligeables, reste incertain. Il a été observé, lors de nombreux travaux, que certaines molécules d'ADN issues de ces recombinaisons pouvaient se retrouver en quantité substoechiométrique, c'est à dire que certaines molécules sont retrouvées, en moyenne, à beaucoup moins d'une copie par cellule (Small et al. 1987; Kanazawa et al. 1994; Yesodi et al. 1995; Suzuki et al. 1996; Gutierrez et al. 1997; Janska et al. 1998). Cette caractéristique est essentiellement due au changement rapide et fréquent du nombre de copies de molécules génomiques. Une des explications avancées pour expliquer ce phénomène est que la subdivision du génome ainsi que la distribution différentielle des molécules subgénomiques peuvent conférer un avantage sélectif par le maintien d'une certaine variabilité (Small et al. 1989).





**Figure 3**

Illustration de la complexité de structure des génomes mitochondriaux de plantes, générée par recombinaison

(a) Une recombinaison entre deux séquences répétées inversées génère une forme isomérique de l'ADN de départ caractérisée par l'inversion de la séquence comprise entre les deux copies de la répétition (l'ordre a-b-c-d devenant a-c-b-d).

(b) Une recombinaison entre deux séquences répétées directes conduit à la formation de deux molécules circulaires subgénomiques, chacune contenant une copie de la répétition.

(c) Une recombinaison entre trois séquences répétées (deux directes et une inversée) génère quatre formes isomériques (chacune contenant la totalité de l'information génétique mais où les séquences ont été permutées) et trois séries de molécules circulaires subgénomiques.

D'après Fauron et al. 1995.

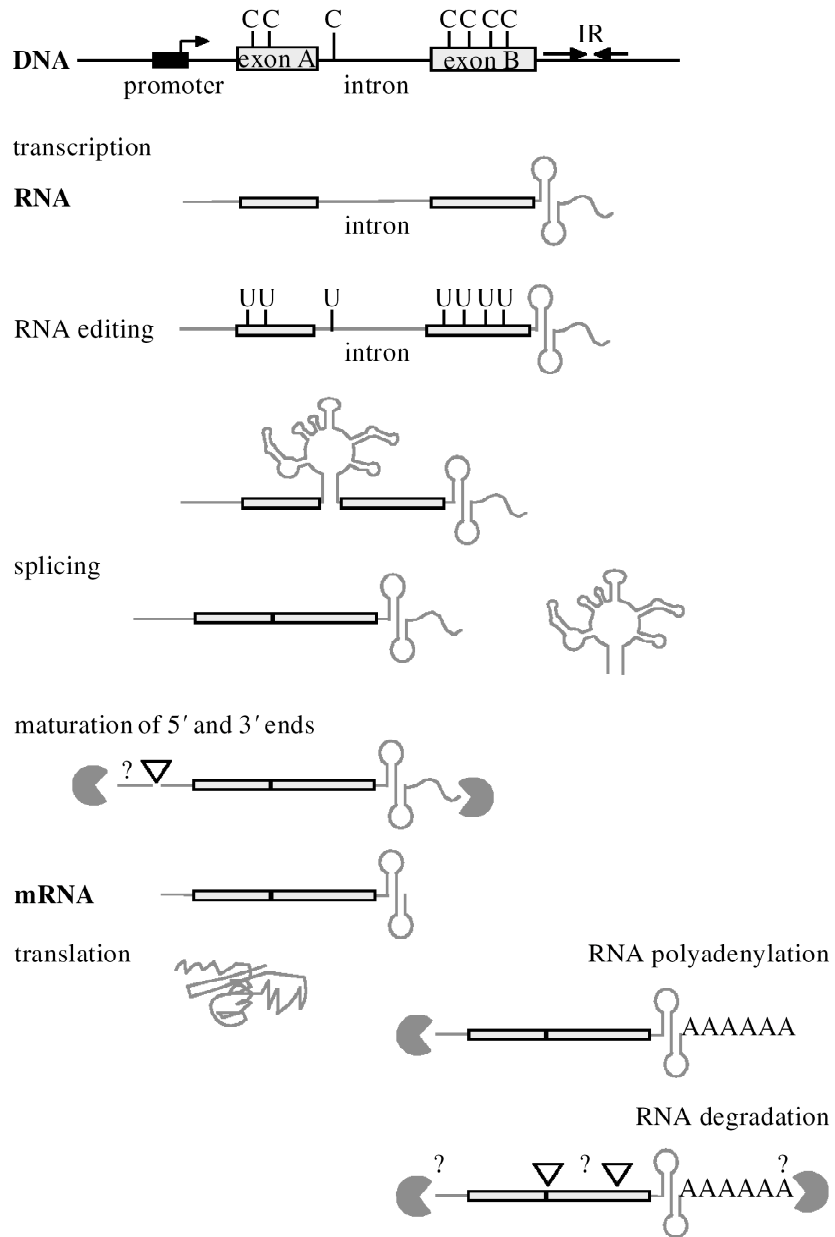
Cette distribution, ainsi que la transmission du génome mitochondrial, sont sous le contrôle de gènes nucléaires. De nombreux travaux ont été menés chez la levure afin de comprendre les mécanismes de contrôle nucléaire de la distribution et de la transmission de l'ADN mitochondrial (Zweifel et al. 1991; Piskur 1994; Lockshon et al. 1995), mais peu d'exemples sont disponibles à ce jour chez les plantes. Nous pouvons citer les gènes *chm* chez *A. thaliana* et *Fr* chez le haricot. Ces deux gènes contrôlent le nombre relatif et la transmission de molécules subgénomiques d'ADN mitochondrial. Une mutation du gène *chm* conduit à l'accumulation, en majorité, de molécules d'ADN mitochondrial contenant des réarrangements avec pour conséquence des délétions des gènes codants pour les protéines ribosomiques S3 et L16 (Martinez-Zapater et al. 1992; Sakamoto et al. 1996; Abdelnoor et al. 2003). Le gène *Fr* contrôle la quantité de molécules subgénomiques contenant le gène *orf239* responsable de la stérilité mâle cytoplasmique *pvs* chez le haricot (Mackenzie et al. 1990; Janska et al. 1998).

Au final, le génome mitochondrial observé chez *A. thaliana*, par exemple, compte 57 gènes dont les produits sont impliqués dans les complexes respiratoires I, III, IV, V, la biogenèse du cytochrome c, mais aussi des ARN ribosomiques, des protéines ribosomiques et des ARN de transfert (Unsold et al. 1997).

## **2-/ Expression des gènes mitochondriaux**

### **2-1/ Transcription et contrôle post-transcriptionnel**

La caractéristique principale de l'expression des gènes mitochondriaux végétaux est l'existence, la plupart du temps, d'un nombre élevé d'ARN messagers observés pour un gène donné, associée à une complexité variable des mécanismes d'expression (figure 4) (pour une revue voir (Gray 1992; Binder et al. 2003). En effet, il existe plusieurs sites d'initiation et de terminaison de transcription ainsi que des phénomènes de clivages post-transcriptionnels et d'épissages importants. De nombreux travaux ont porté sur l'étude des promoteurs mitochondriaux et il semble exister plusieurs classes de promoteurs recrutant leurs propres facteurs de transcription. On peut citer le gène *Mct* chez des lignées alloplasmiques mâle stériles de maïs (lignées possédant un noyau de maïs, mais un cytoplasme de téosinte) qui détermine le nombre de transcrits du gène codant pour la sous-unité 2 de la cytochrome oxydase (Cooper et al. 1990; Newton et al. 1995).



**Figure 4**

Schéma des différentes étapes de maturation d'un ARN messager mitochondrial chez les plantes. Les modifications post-transcriptionnelles comprennent l'édition, l'épissage des introns et la maturation des extrémités 5' et 3'. Un contrôle sur l'expression du génome peut être effectué à chacune de ces étapes. L'activité des gènes peut être également modulée au niveau des promoteurs et pendant et après la traduction. L'expression du gène prend fin avec la dégradation de l'ARN messager qui peut être stimulée par des séquences polyadénylées.

IR : séquence répétée inversée

D'après Binder et al. 2003.

La régulation des gènes mitochondriaux s'effectue essentiellement par le produit de gènes nucléaires (Binder et al. 2003). C'est le cas, par exemple, de certains gènes de restauration de la fertilité qui influencent l'accumulation de transcrits de gènes mitochondriaux responsables de stérilités mâles cytoplasmiques (Dill et al. 1997).

Les extrémités 5' et 3' des ARN messagers mitochondriaux sont produites, le plus souvent, par une maturation post-transcriptionnelle. Le clivage des ARN s'effectue pour la grande majorité des cas d'abord en 5' puis en 3' jusqu'aux structures spécifiques en tige boucle résultant de la présence de séquences répétées inversées (Schuster et al. 1986; Gagliardi et al. 2001) qui sont résistantes aux exonucléases (figure 4).

### 2-2/ Edition

L'édition des ARN messagers est un phénomène de modification post-transcriptionnelle retrouvé très majoritairement dans les mitochondries végétales et les chloroplastes qui consiste le plus souvent en un changement de base cytidine en base uracyle après transcription (figure 4) (Smith et al. 1997). Ce phénomène a été observé pour la quasi totalité des transcrits mitochondriaux de plantes. Chez *A. thaliana*, par exemple, 441 sites d'édition ont été identifiés (Giege et al. 1999). Ces changements peuvent se localiser dans les régions codantes, les introns et les extrémités non codantes. Une des caractéristiques originales de ce phénomène est que sur la totalité des transcrits issus d'un même gène, on peut observer une certaine proportion de molécules non éditées. La proportion de transcrits édités dépend du type cellulaire, du stade de développement et des conditions de croissance (Grosskopf et al. 1996). La spécificité des sites édités dépend de facteurs *cis* et de facteurs *trans*. Bien qu'aucun consensus de séquence ne puisse être établi aujourd'hui, les facteurs *cis* semblent être composés des 20 nucléotides précédant le site d'édition ainsi que des 2 nucléotides le suivant (Takenaka et al. 2004). Les facteurs *trans* restent à ce jour inconnus. La multiplicité et la variation de séquences des sites d'édition suggèrent qu'une grande famille multigénique comme celle des gènes codant des protéines à motifs PPR (pentatricopeptide repeat) pourrait être impliquée dans ce phénomène (Small et al. 2000).

Une des autres caractéristiques originales de ce système est que, pour certains gènes, les transcrits édités et non édités sont compétents pour la traduction (Lu et al. 1996) alors que seuls les peptides issus de la traduction de transcrits édités sont assemblés dans les complexes (Phreaner et al. 1996). Toutefois, la traduction de messagers non édités a été observée dans un nombre très limité de cas (Grohmann et al. 1994). Le processus de sélection éventuel des transcrits permettant la synthèse des protéines fonctionnelles correspondantes et un assemblage adéquat dans les complexes protéiques reste à ce jour inconnu (Grohmann et al. 1994).

### 2-3/ Régulations post-traductionnelles

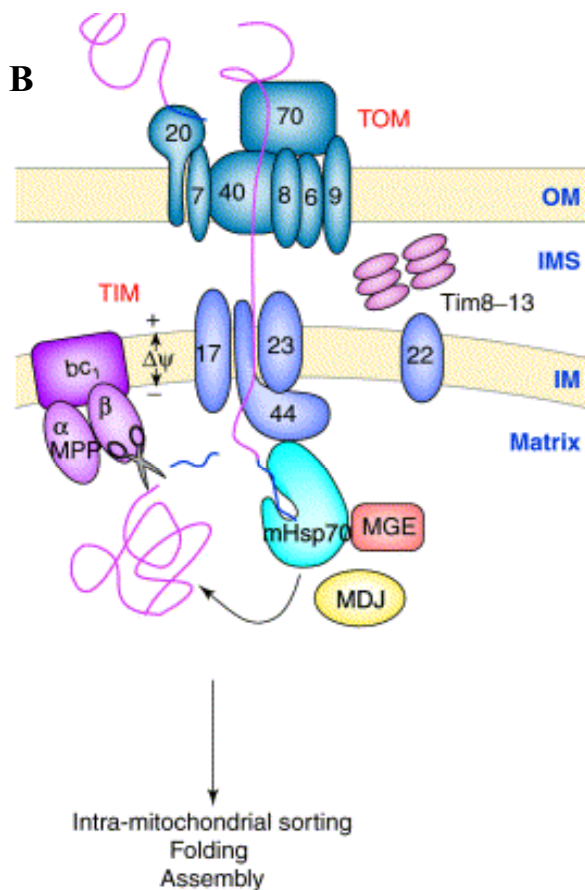
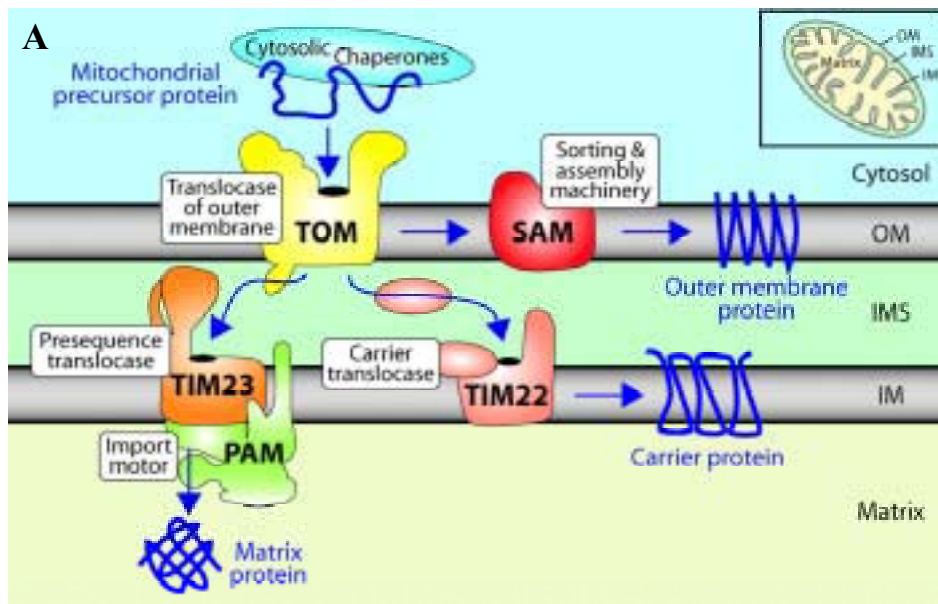
La gestion des protéines issues de transcrits édités et non édités est cruciale pour le bon assemblage des complexes protéiques mitochondriaux. En effet, seules les protéines issues de transcrits édités doivent être incorporées et les formes issues de transcrits non édités sont très rarement détectées, même lorsque la proportion de ces formes est importante (Williams et al. 1998) suggérant ainsi une dégradation très rapide et efficace. Les protéases mitochondriales ont été essentiellement décrites chez la levure (pour une revue voir Rep et al. 1996). Chez les végétaux, peu de données ont été rapportées à ce jour. Notamment, aucune activité protéolytique n'a été détectée dans les mitochondries végétales à part les activités de maturation moléculaire liées à l'importation des protéines codées par des gènes nucléaires (Szigyarto et al. 1998). Cependant, la régulation de l'accumulation de la protéine ORF239 impliquée dans une stérilité mâle cytoplasmique de haricot et l'un des seuls cas où une régulation protéolytique a pu être observée. En effet, la présence de la protéine ORF239 est contrôlée par une LON-like protéase localisée dans la membrane interne mitochondriale (Sarria et al. 1998). Chez la levure, les LON protéases mitochondriales possèdent un rôle indispensable dans la régulation de protéines responsables de fonctions essentielles telles que les sous-unités des complexes respiratoires (Suzuki et al. 1994; Van Dyck et al. 1994; van Dijn et al. 1998).

### **3-/ Les mécanismes d'importation dans la mitochondrie de protéines codées par des gènes nucléaires**

Plus de 98% des protéines présentes dans les mitochondries sont codées par des gènes nucléaires. Ces protéines sont traduites dans le cytosol puis transportées jusqu'à la mitochondrie. Le processus d'importation repose sur l'interaction spécifique entre des signaux, la plupart du temps situés à l'extrémité N terminale des protéines et appelés préséquences, et des composants de l'appareil d'importation (figure 5). Le système a été largement décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez *Neurospora crassa* (Revue par Neupert 1997; Pfanner et al. 1997). Néanmoins, les mécanismes et les spécificités liés au phénomène d'importation sont suffisamment partagés par tous les eucaryotes, pour que des protéines de levures puissent être importées par des mitochondries végétales et également que des préséquences végétales permettent un adressage mitochondrial chez la levure (Bowler et al. 1989; Schmitz et al. 1989; Huang et al. 1995).

#### **3-1/ Caractéristiques des préséquences**

Les caractéristiques des préséquences mitochondriales chez les végétaux ont été bien décrites (Glaser et al. 1998; Schneider et al. 1998). Pour résumer, les préséquences sont constituées de 18 à 107 acides aminés, riches en résidus chargés positivement (Arg et Lys), en résidus hydrophobes (Ala, Leu, Phe, Val) et en résidus hydroxylés (Ser et Thr). Les trois résidus majoritaires de ces préséquences sont les résidus Ser (17% des résidus présents dans la préséquence), Ala (12%) et Arg (12%). Les préséquences des protéines végétales sont bien plus complexes que celles d'autres eucaryotes et ceci est probablement dû à l'existence d'autres mécanismes d'importation dans le chloroplaste. Il semblerait que, dans certains cas, l'état de phosphorylation des préséquences permettrait aux différents mécanismes cellulaires de différencier un adressage mitochondrial d'un adressage chloroplastique (Heins et al. 1998). Deux principales classes de préséquences peuvent être identifiées : la première comprend les signaux de toutes les protéines matricielles, de certaines protéines de l'espace intermembranaire et de la membrane interne ; la deuxième comprend les préséquences de toutes les protéines de la membrane externe, de certaines protéines de l'espace intermembranaire et de la membrane interne. Ces dernières ne sont pas clivées lors du processus d'importation conférant au précurseur la même taille que la protéine mature.



**Figure 5**

Appareils d'importation protéique mitochondriaux de levure (A) et de plante (B).

A l'aide de protéines chaperones, les précurseurs protéiques maintenus sous une forme compétente pour l'importation sont transférés sur le complexe TOM où il sont ensuite dirigés vers les différents compartiments submitochondriaux. Les protéines de la membrane externe sont prises en charge par le complexe SAM alors que les protéines matricielles ou de la membrane interne sont dirigées soit vers le complexe TIM23 soit vers le complexe TIM 22. Les préséquences des protéines matricielles sont ensuite clivées par les enzymes de maturation moléculaire dont la MPP. Elle est matricielle chez la levure (non montrée sur le schéma) et intégrée au complexe cytochrome bc1 de la chaîne respiratoire chez les plantes (B)

TOM : translocase de la membrane externe

TIM : translocase de la membrane interne

SAM : sorting and assembly machinery

PAM : Presequence translocase associated motor

OM : membrane externe

IM : membrane interne

IMS : espace intermembranaire

MPP : peptidase de maturation mitochondriale

MGE : GrpE mitochondriale

MDJ : DnaJ mitochondriale

D'après Wiedemann et al. 2004 (A) et Zhang et al. 2002 (B)

### 3-2/ L'appareil d'importation

L'appareil d'importation est constitué de trois grand types de protéines :

1- les translocases : ces protéines sont situées dans les membranes externes et internes mitochondriales. Elles participent au passage de la protéine importée à travers les membranes ou éventuellement à l'insertion dans la membrane adéquate de protéines membranaires.

2- les enzymes de maturation moléculaire : ces protéines sont des enzymes qui permettent l'excision de la préséquence dès que la protéine importée a atteint sa destination.

3- les chaperones : ces protéines peuvent être cytosoliques ou mitochondriales. Les premières permettent de garder la protéine sous une conformation compatible avec l'importation. Les deuxièmes sont responsables de la translocation à travers les membranes, du bon repliement de la protéine une fois importée et de l'assemblage correct des complexes protéiques.

Il est intéressant de noter que deux composants majeurs dans le système d'importation végétal (les translocases de la membrane externe et une enzyme de maturation : la MPP pour mitochondrial processing peptidase) présentent des caractéristiques uniques comparées à leurs homologues chez les mammifères ou la levure.

#### 3-2-1/ Les translocases

La nomenclature des translocases a été définie par (Pfanner et al. 1996). Les translocases situées dans la membrane externe mitochondriale sont nommées TOM (Translocase Outer Membrane) et les translocases situés dans la membrane interne mitochondriale sont appelées TIM (Translocase Inner Membrane). Ces trois lettres sont suivies d'un numéro correspondant au poids moléculaire de la protéine considérée.

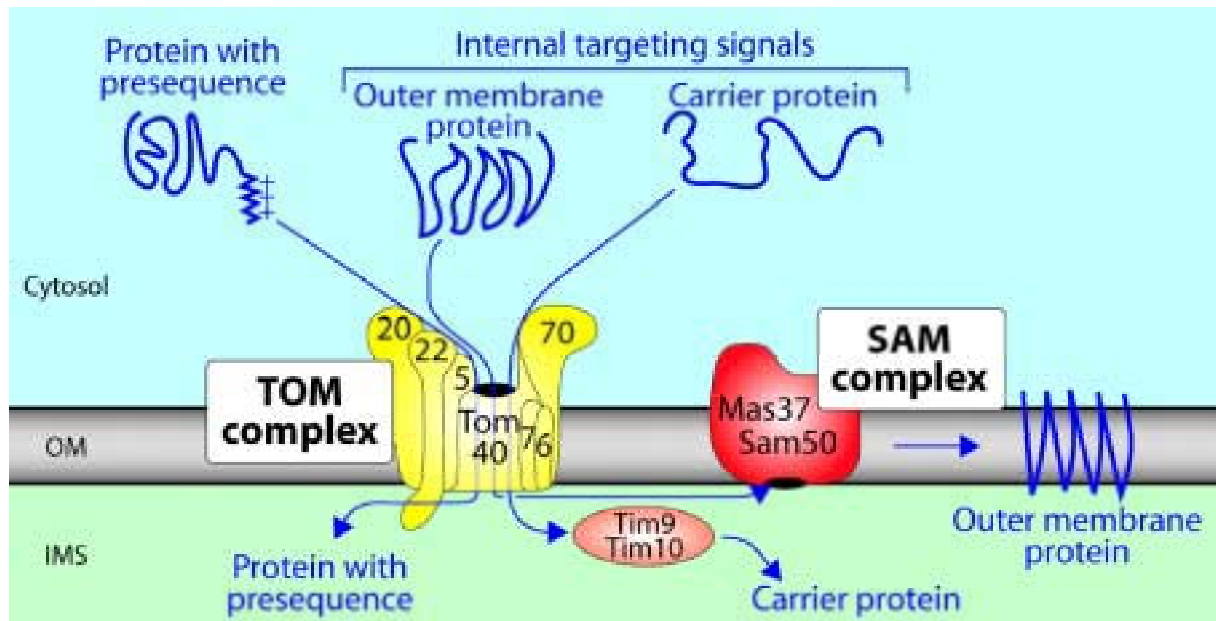


### 3-2-1-1/ Les protéines TOM

Ces protéines jouent un rôle primordial dans le mécanisme d'importation car elles permettent la reconnaissance puis la translocation de la protéine à importer (figure 6). Le complexe TOM peut être décomposé en deux entités : un récepteur périphérique à la membrane où les protéines TOM sont impliquées dans la reconnaissance spécifique des précurseurs mitochondriaux et un pore intrinsèque à la membrane qui permet la translocation du précurseur à travers celle-ci.

Chez *S. cerevisiae* et *N. crassa*, le récepteur périphérique est constitué de cinq protéines : TOM72, TOM70, TOM37, TOM22 et TOM20 (Kiebler et al. 1990; Moczko et al. 1992; Sollner et al. 1992). Ces protéines formeraient des complexes hétérodimériques TOM20-TOM22 et TOM37-TOM70 ou TOM37-TOM72. Ces complexes sont responsables de la reconnaissance ainsi que de la fixation des préséquences sur le récepteur (Brix et al. 1997; Abe et al. 2000). Chez *A. thaliana* et la pomme de terre, quatre protéines TOM périphériques ont pu être détectées à ce jour. Les deux premières présentent un poids moléculaire de 21 et 23 kDa et pourrait être les orthologues de TOM20 (Werhahn et al. 2001). La troisième présente un poids moléculaire de 70 kDa et pourrait être l'orthologue de TOM70 ou de TOM72 (Jansch et al. 1998). L'orthologue potentiel de TOM37 est probablement une protéine de 34 kDa (Jansch et al. 1998; Werhahn et al. 2001).

Le pore intrinsèque de *S. cerevisiae* et *N. crassa* est constitué de 4 protéines TOM40, TOM7, TOM6 et TOM5. La protéine TOM40 forme un pore et permet, à l'aide de la protéine TOM5, le passage du précurseur à travers la membrane (Komiya et al. 1998; Meisinger et al. 2001). Les protéines TOM6 et TOM7 n'interagissent pas directement avec le précurseur mais sont indispensables à formation et à la stabilisation du complexe TOM (Model et al. 2001). Chez les végétaux, la protéine TOM40 a été identifiée chez *A. thaliana* et la pomme de terre. Des protéines de 9, 8, 7 et 6 kDa ont pu également être détectées chez la pomme de terre et seule la protéine de 7 kDa possède des homologies de séquence avec la protéine TOM7 de levure (Jansch et al. 1998).



**Figure 6**

Translocation des protéines à travers et dans la membrane externe chez la levure.

La préséquence des précurseurs est reconnue par le complexe TOM, les protéines TOM40 (pore) et TOM5 permettant le passage du précurseur à travers la membrane. Les protéines de la membrane externe sont ensuite dirigées vers le complexe SAM pour leur insertion dans la membrane.

TOM : translocase de la membrane externe

SAM : sorting and assembly machinery

OM : membrane externe

IMS : espace intermembranaire

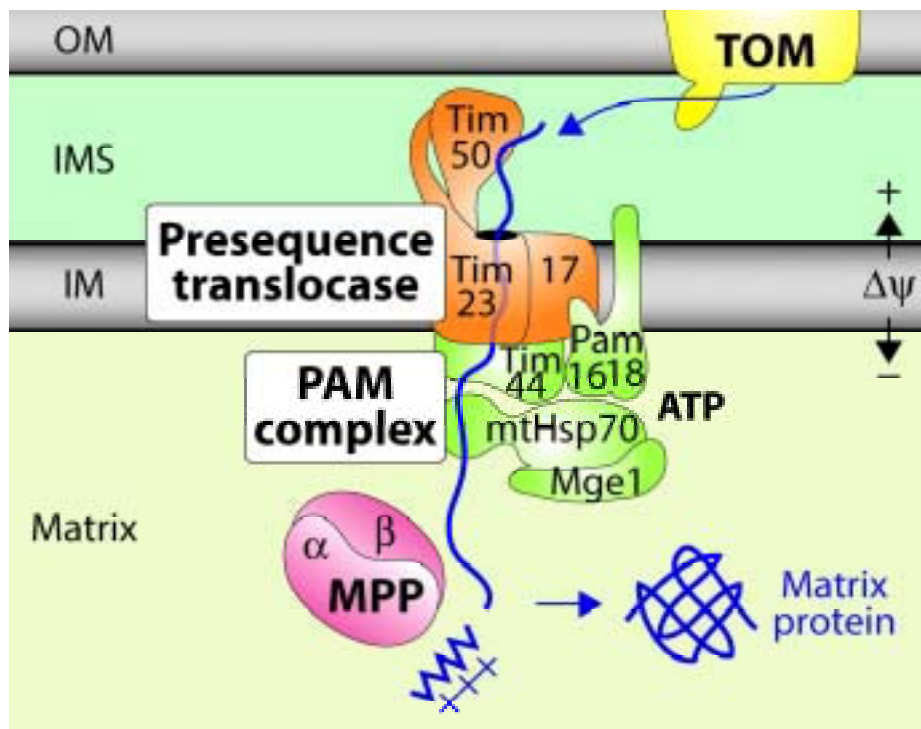
D'après Wiedeman et al. 2004

Il semblerait que le récepteur périphérique ne soit pas toujours associé au pore intrinsèque mais formerait plutôt une entité autonome capable de se déplacer latéralement dans la membrane (Werhahn et al. 2001). Cette caractéristique rend la purification des complexes TOM ainsi que la détermination de leur poids moléculaire exact difficiles. Cependant, le poids du complexe TOM a pu être identifié chez *Neurospora crassa* et chez la pomme de terre. Il est respectivement de 500 et de 230 kDa (Kiebler et al. 1990; Jansch et al. 1998).

Une fois le précurseur transloqué, il va rejoindre et intégrer la membrane externe à l'aide du complexe SAM (sorting and assembly machinery) (Hoppins et al. 2004; Wiedemann et al. 2004) ou bien être pris en charge par les complexes TIM.

### 3-2-1-2/ Les protéines TIM

Contrairement aux protéines TOM, nous disposons de peu d'information sur les complexes TIM chez les végétaux. Chez la levure, deux complexes TIM ont pu être identifiés et possèdent des spécificités d'importation relatives à la nature de la préséquence : TIM17-TIM23 et TIM22-TIM54 (Berthold et al. 1995; Kerscher et al. 1997). Le complexe TIM17-TIM23 (figure 7) permet l'importation de protéines matricielles et de certaines protéines de l'espace intermembranaire grâce à la présence d'un potentiel de membrane. Ce potentiel permet d'activer le pore formé par la protéine TIM23 mais aussi de créer un effet électrophorétique sur les précurseurs. Ces facteurs conduisent au passage des précurseurs à travers la membrane interne (Truscott et al. 2001; Huang et al. 2002). Dans certains cas, la préséquence possède ce qu'on appelle un signal hydrophobe d'arrêt de transfert. Les précurseurs correspondants ne traversent pas la membrane, mais sont pris en charge par le complexe PAM (presequence translocase associated motor). C'est un complexe de translocation ATP-dépendant constitué des protéines TIM44, mHSP70 et MGE (mitochondrial GrpE) (Voos et al. 1993). Le mécanisme d'importation repose alors sur l'activation de la protéine mHSP70 par l'ATP. Cette activation provoque l'interaction avec la protéine TIM44 et le précurseur. L'hydrolyse de l'ATP permet à la protéine MGE la prise en charge puis le passage du précurseur ainsi que le recyclage de la protéine mHSP70. Chez *A. thaliana*, des EST codant des protéines similaires à TIM17 et TIM23 ont été trouvées (Bomer et al. 1996) et les poids moléculaires théoriques correspondants sont de 20 et 25 kDa (Braun et al. 1999). Les gènes correspondants ont été identifiés chez *A. thaliana* et leur étude est en cours (Murtha et al. 2003).



**Figure 7**

Importation des protéines matricielles chez la levure.

Après avoir passé le complexe TOM, les précurseurs sont reconnus par le complexe TIM 23. Leur passage à travers ce pore nécessite la présence d'un potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ). Dans le cas de protéines possédant un signal hydrophobe d'arrêt de transfert, leur passage est opéré par le complexe PAM dont l'élément central est la protéine mHSP70. Une fois dans la matrice la préséquence est clivée par la MPP.

TOM : translocase de la membrane externe

TIM : translocase de la membrane interne

PAM : presequence translocase associated motor

MPP : peptidase de maturation mitochondriale

OM : membrane externe

IMS : espace intermembranaire

IM : membrane interne

mtHSP70 : protéine chaperone 70 mitochondriale

MGE : GrpE mitochondriale

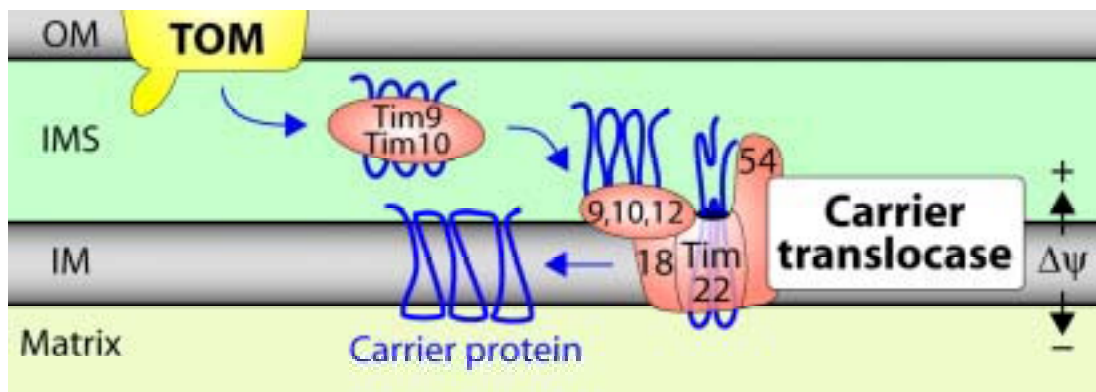
D'après Wiedemann et al. 2004

Le complexe TIM22-TIM54 (figure 8) est beaucoup moins bien connu car sa caractérisation chez la levure s'est faite plus tardivement. Ce complexe permet l'insertion de protéines hydrophobes dans la membrane interne. Il est composé des protéines TIM22, TIM54 qui forment le centre du complexe et des 6 protéines périphériques : TIM8, TIM9, TIM10, TIM12, TIM13 et TIM18 (Kerscher et al. 1997; Rehling et al. 2003). Le complexe TIM9-TIM10 permet le passage du précurseur du complexe TOM au complexe TIM à travers l'espace intermembranaire (Curran et al. 2002; Vial et al. 2002). A l'aide de la protéine TIM12, le précurseur est associé au complexe TIM22-TIM54 (Sirrenberg et al. 1996; Kovermann et al. 2002). Le potentiel de membrane permet l'insertion puis le passage du précurseur à travers le pore formé par la protéine TIM22 puis son insertion dans la membrane (Rehling et al. 2003). Les fonctions des protéines TIM54 et TIM18 ne sont pas encore totalement définies. Les seuls homologues identifiés chez les plantes sont les homologues de protéines TIM9 et TIM10 présents chez la pomme de terre (Lister et al. 2002).

Un autre composant de la machinerie d'importation localisée dans la membrane interne et qui permet l'insertion des protéines importées dans cette membrane est la protéine OXA1 identifiée comme une protéine de 48 kDa chez la levure (Hell et al. 1997) et de 38 kDa chez *A. thaliana* (Hamel et al. 1997; Sakamoto et al. 2000). Sa fonction principale identifiée chez la levure est le contrôle de la bonne insertion et du bon assemblage des complexes respiratoires. Elle est également impliquée dans l'exportation et l'insertion dans la membrane de protéines codées par le génome mitochondrial (Hell et al. 1998; Herrmann et al. 2004).

### 3-2-2/ Les enzymes de maturation moléculaire

Les protéines mitochondriales codées par des gènes nucléaires sont synthétisées avec une préséquence qui est la plupart du temps clivée lors de l'importation. Il existe pour certaines protéines un second domaine permettant l'adressage submitochondrial à partir de la matrice (pour une revue voir Gakh et al. 2002). Ces maturations sont essentielles pour le bon assemblage des complexes mitochondriaux et l'altération de ces fonctions conduit chez l'homme à des maladies mitochondriales sévères (Gakh et al. 2002).



### Figure 8

Insertion dans la membrane mitochondriale des protéines importées par la mitochondrie de levure.

Le complexe TIM9-TIM10 conduit le précurseur du complexe TOM au complexe TIM22-TIM54 de la membrane interne. Le potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) permet le passage de la protéine puis son insertion dans la membrane.

TOM : translocase de la membrane externe

TIM : translocase de la membrane interne

OM : membrane externe

IMS : espace intermembranaire

IM : membrane interne

D'après Wiedemann et al. 2004

Les domaines d'adressage matriciel des protéines mitochondriales sont clivés par une enzyme appelée MPP (mitochondrial processing peptidase) alors que les domaines d'adressage intramitochondrial sont clivés par l'IMP (inner membrane peptidase) (Schneider et al. 1991; Nunnari et al. 1993). Il existe également une troisième enzyme appelée MIP (mitochondrial intermediate peptidase) qui agit sur les produits maturés par la MPP et clive les octapeptides N terminaux révélés par celle-ci (Kalousek et al. 1992).

### *3-2-2-1/ La MPP*

La MPP a été purifiée chez la levure, les mammifères et les plantes (revue par Braun et al. 1997). L'enzyme est une metallopeptidase constituée de deux-sous unités appelées  $\alpha$  et  $\beta$ . Il semblerait que la sous-unité  $\alpha$  soit impliquée dans la reconnaissance du substrat et que la sous-unité  $\beta$  permette le clivage des peptides. Chez les mammifères et la levure, cette enzyme est localisée dans la matrice mitochondriale. Chez les végétaux, cette activité est intégrée au complexe III (cytochrome bc1) de la chaîne respiratoire (figure 5B) (Braun et al. 1992). Il est assez clair aujourd'hui que le complexe III agit comme une enzyme bifonctionnelle car l'altération de la fonction respiratoire n'influence pas la fonction MPP et vice versa (Emmermann et al. 1993; Glaser et al. 1999; Dessi et al. 2000).

### *3-2-2-1/ Les IMP et MIP*

Ces enzymes sont les derniers acteurs de la maturation des protéines importées. Leur activité dépend de celle de la MPP. Chez la levure, le complexe IMP, est un hétérodimère IMP1-IMP2 (Nunnari et al. 1993; Pratje et al. 1994; Schneider et al. 1994). Les deux protéines semblent avoir une activité catalytique. La protéine IMP1 a pour substrat les protéines COX2 (cytochrome c oxydase 2), MCR1 (NADH cytochrome b5 réductase) et le précurseur du cytochrome b2. La protéine IMP2 permet la maturation du précurseur du cytochrome c1 et joue un rôle dans la stabilisation de l'hétérodimère. Une troisième protéine, plus récemment identifiée se nomme SOM1. Sa présence semble être nécessaire au clivage des protéines COX2 et MCR1 et elle pourrait également jouer un rôle dans la reconnaissance du substrat (Jan et al. 2000).

Chez la levure, la MIP est une protéine soluble de 70 kDa qui reconnaît et excise une séquence consensus R-X-(F/L/I)-X-X-(T/S/G)-X-X-X-X en C-terminal de la séquence à cliver (Hendrick et al. 1989; Gavel et al. 1990).

Aucune de ces enzymes n'a pu être identifiée chez les végétaux jusqu'à présent. Néanmoins l'existence de préséquences bipartites suggère qu'une fonction IMP existe chez les mitochondries de plantes (Braun et al. 1992). Par contre plusieurs données suggèrent que la fonction MIP n'existe pas chez les plantes. En effet, les préséquences mitochondriales végétales ne présentent pas de motifs reconnus par la MIP de levure et de surcroît un lysat mitochondrial végétal ne permet pas le clivage de protéines qui sont la cible de la MIP de levure (Emmermann et al. 1994).

### 3-2-3/ Les chaperones

Les chaperones sont des protéines impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires. Pour les mécanismes d'importation, on peut distinguer les chaperones cytosoliques des chaperones mitochondriales.

#### *3-2-3-1/ Les chaperones cytosoliques*

Peu d'informations sont disponibles sur les chaperones cytosoliques végétales qui permettent de garder les protéines sous une forme compatible avec l'importation. Nous pouvons néanmoins citer les protéines HSP70, PBF (presequence binding factor) et MSF (mitochondrial import stimulation factor) (Hachiya et al. 1994). Ces facteurs se fixent au précurseur afin d'éviter qu'il ne s'aggrave et le gardent dans un état permettant son importation. Il semble également que la protéine HSP70 favorise les interactions entre la préséquence et la protéine TOM20 (Abe et al. 2000).

#### *3-2-3-1/ Les chaperones mitochondriales*

Une fois les protéines importées dans la mitochondrie, elles doivent prendre leur conformation adéquate et parfois être assemblées dans des complexes protéiques. Chez *S. cerevisiae* et *N. crassa*, deux complexes ont pu être identifiés : mHSP70-MDJ-MGE (homologue du complexe DnaK-DnaJ-GrpE de bactérie) et mHSP60-mHSP10 (équivalent du complexe GroEL-GroES de bactérie) (Reuves par Neupert 1997; Pfanner et al. 1997).



Nous avons vu précédemment que les protéines mHSP70 et MGE sont également impliquées dans la translocation de précurseurs à travers la membrane interne. Elles ont aussi la capacité de contrôler le bon repliement des protéines matricielles jusqu'à l'acquisition de leur conformation adéquate après importation (Stuart et al. 1994; Rospert et al. 1996).

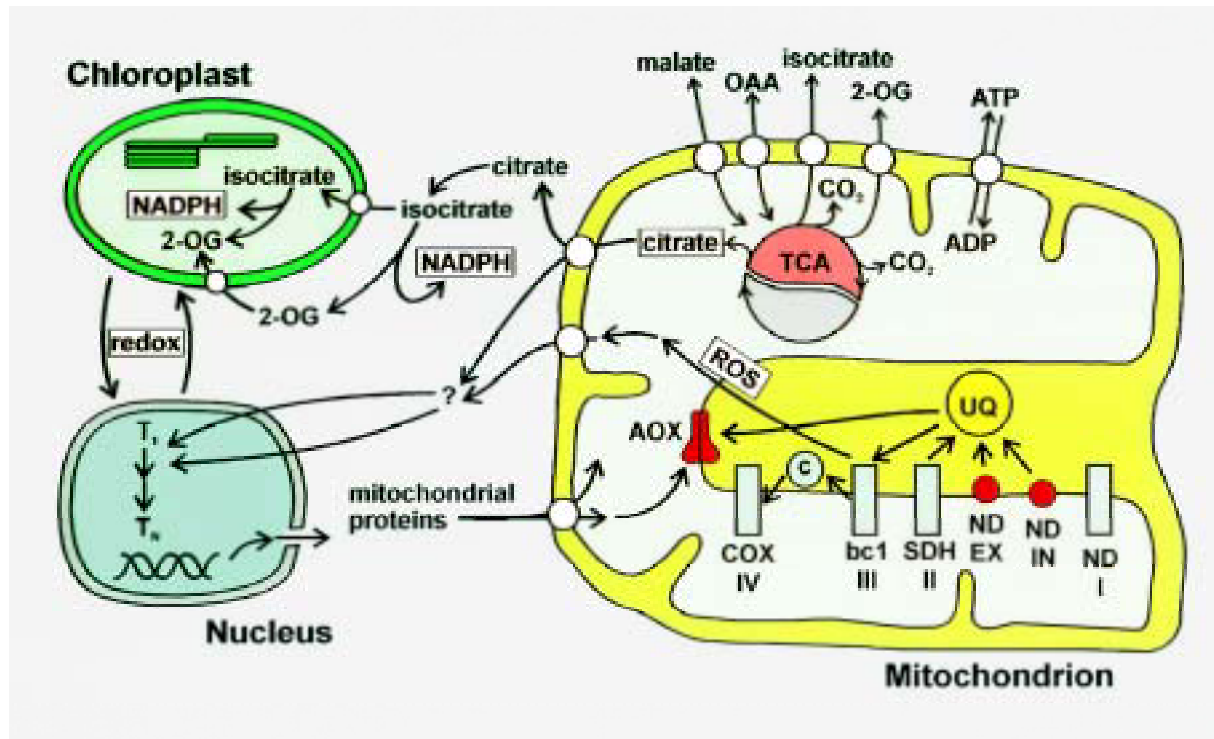
Les protéines mHSP60 et mHSP10 sont des composants essentiels du complexe de maturation mitochondriale. Ce complexe est indispensable pour l'assemblage de complexes multiprotéiques en favorisant les formes dans leur conformation dite "native" (Cheng et al. 1989; Cheng et al. 1990).

Les protéines mHSP70, MGE, MDJ, mHSP60 et mHSP10 ont été identifiées chez les plantes (Prasad et al. 1989; Hartman et al. 1992; Watts et al. 1992; Kroczyńska et al. 1996; Padidam et al. 1999) et présentent des caractéristiques similaires à celles de levure.

## **4-/ Le métabolisme mitochondrial**

### *4-1/ Généralités*

Une des fonctions les plus importantes et les plus connues de la mitochondrie est la production d'énergie par le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (figure 9). La glycolyse située dans le cytoplasme permet la production de pyruvate, de NADH et d'ATP à partir de glucose. Une certaine proportion du pyruvate est impliquée dans la fermentation alcoolique et une autre partie est transportée dans la mitochondrie. Son oxydation en acétylcoenzyme A permet au cycle de Krebs de produire du CO<sub>2</sub>, 2 molécules d'ATP, 6 molécules de NADH et 2 molécules de FADH<sub>2</sub>. Le cycle de Krebs fournit ainsi les différents substrats des complexes respiratoires et du métabolisme général de la cellule. Ces substrats diffusent passivement ou alors sont transportés activement hors de la mitochondrie pour participer à de nombreux mécanismes cellulaires. Si le cycle de Krebs est un carrefour métabolique dans le fonctionnement cellulaire, la production d'ATP est principalement due à la phosphorylation oxydative au sein de la chaîne respiratoire.



**Figure 9**

Schéma général du métabolisme mitochondrial et ses relations avec les chloroplastes et le noyau. Les flèches représentent des flux de substrats, d'électrons ou d'information

ND I : complexe I

ND IN : NADH deshydrogenase interne

ND EX : NADH deshydrogenase externe

SDH II : complexe II

bc1 III : complexe III

C : cytochrome c

COX IV : complexe IV

AOX : alternative oxydase

UQ : ubiquinone

ROS : espèces réactives d'oxygène

TCA : cycle de Krebs

OAA : oxaloacétate

2-OG : 2-oxoglutarate

D'après Mackenzie et al. 1999

#### 4-2/ La chaîne respiratoire

Elle est composée de cinq complexes protéiques membranaires appelés complexes I, II, III, IV et V situés dans la membrane interne mitochondriale (figure 10). Chez les végétaux, les génomes nucléaire et mitochondrial participent tous les deux au codage des sous-unités des complexes excepté pour le complexe II où seul le génome nucléaire est impliqué. La phosphorylation oxydative est caractérisée par un transfert d'électrons du complexe I au complexe IV, permis par l'oxydation et la réduction de différentes molécules comme l'ubiquinone et le cytochrome c. Ce transfert est accompagné d'une consommation d'oxygène et d'une production d'ATP utilisant le gradient électrochimique de protons généré par les complexes I, III et IV. Un très grand nombre de travaux ont permis d'aboutir à une connaissance très détaillée de la constitution et des fonctions des différents complexes.

##### Le complexe I (ou NADH ubiquinone oxydoréductase)

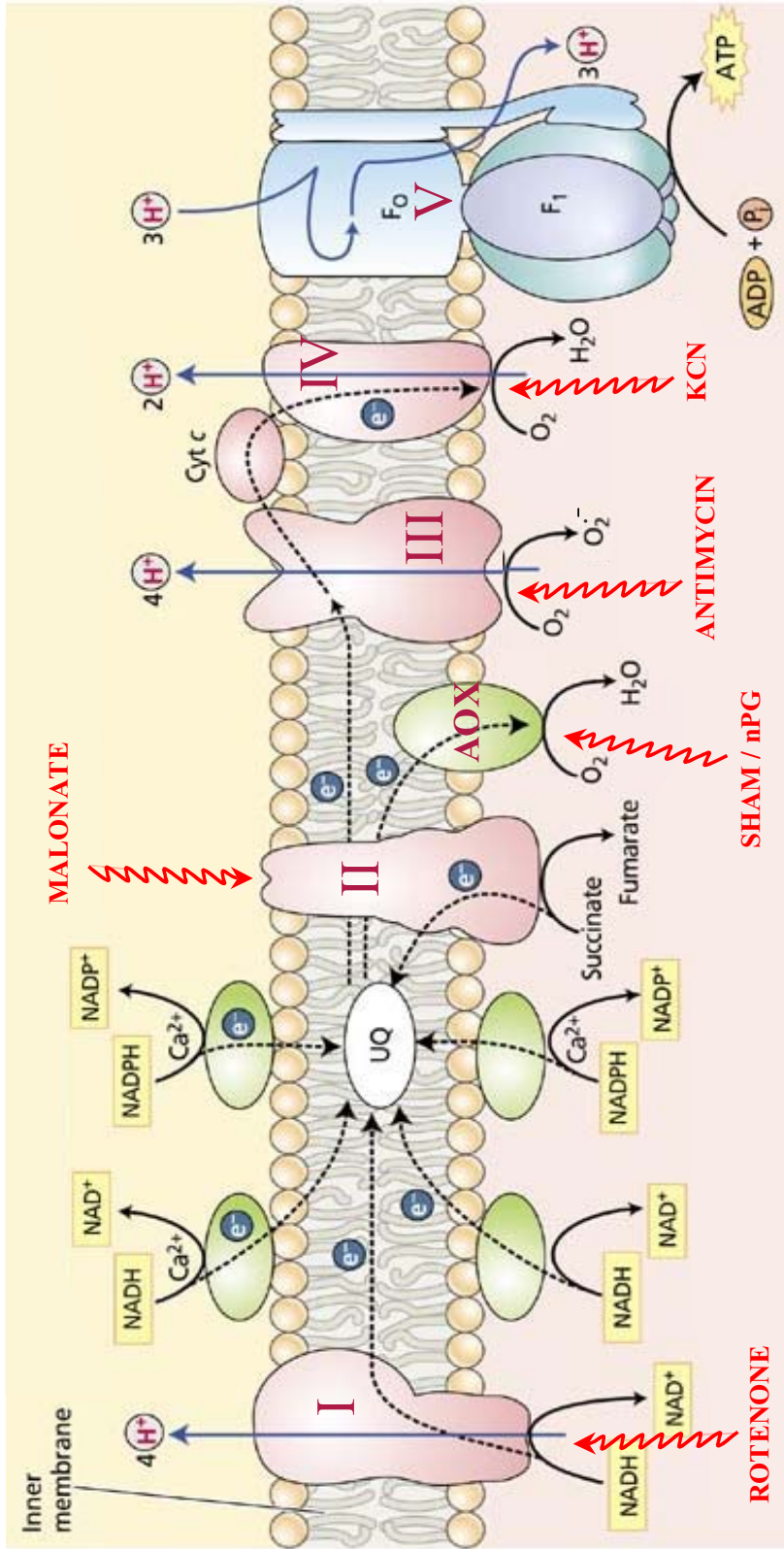
Ce complexe possède un poids moléculaire de 900 à 1000 kDa et permet l'oxydation du NADH fourni par le cycle de Krebs en  $\text{NAD}^+$ . Cette réaction est accompagnée d'un transfert d'électrons à l'ubiquinone (molécule liposoluble circulant dans la membrane interne) et de protons vers l'espace intermembranaire.

##### Le complexe II (ou succinate : ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase)

C'est un composant du cycle de Krebs qui permet l'oxydation du succinate en fumarate accompagnée d'un transfert d'électrons à l'ubiquinone ainsi que la réduction du FAD en  $\text{FADH}_2$ . Le complexe II ne transfère pas de protons vers l'espace intermembranaire.

##### Le complexe III (ou ubiquinone cytochrome c oxydoréductase ou cytochrome bc1)

Ce complexe permet le transfert d'électrons de l'ubiquinone au cytochrome c (petite protéine soluble de 12 kDa présente dans l'espace intermembranaire) accompagné de la réduction de l'oxygène en eau et de la translocation de protons vers l'espace intermembranaire. Il est à noter que dans ce cas la réduction de l'oxygène en eau ne s'effectue pas directement mais que le produit de la réaction est l'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  qui fait partie des espèces réactives d'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS). Par ailleurs, chez les végétaux, le complexe III possède une activité protéasique impliquée dans le mécanisme d'importation des protéines (Braun et al. 1992) (cf paragraphe 3-2-2-1).



**Figure 10**

Organisation de la chaîne respiratoire au sein de la membrane interne des mitochondries végétales. En plus des cinq complexes retrouvés chez la quasi totalité des eucaryotes, la chaîne de transport des électrons des mitochondries végétales contient 5 enzymes additionnelles représentées en vert. Ce sont l'AOX, les NAD(P)H deshydrogénases externes et internes. Aucune de ces enzymes ne participe à l'établissement du gradient électrochimique. Les inhibiteurs spécifiques de chaque enzyme sont représentés en rouge. Les flèches en pointillés représentent des transferts d'électrons. Les flèches noires représentent des flux de substrats et les flèches bleues représentent des transferts de protons.

SHAM : acide salicylhydroxylamique

nPG : n-propyl Gallate

AOX : alternative oxydase

UQ : ubiquinone

D'après Plant Physiology Online <http://www.plantphys.net/article.php?ch=t&id=147>

#### Le complexe IV (ou cytochrome c oxydase)

C'est l'accepteur final d'électrons. L'oxydation du cytochrome c se couple à un transfert de protons vers l'espace intermembranaire et à la réduction de l'oxygène en eau.

#### Le complexe V (ou F1-F0 ATP synthase)

Ce complexe utilise le gradient électrochimique généré par la translocation de protons des complexes I, III et IV pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Il est composé d'un corps membranaire F0 et d'une tête soluble F1.

Comparée aux mitochondries de mammifères, la chaîne respiratoire des plantes mais aussi celle des champignons et de certaines levures comporte des éléments supplémentaires :

1- La présence de NAD(P)H déshydrogénases additionnelles situées de part et d'autre de la membrane interne et ainsi appelées déshydrogénases internes et externes (Cook et al. 1984; Rasmusson et al. 1991).

2- La présence d'une oxydase appelée alternative oxydase (AOX) et qui permet le transfert d'électrons du pool d'ubiquinones directement vers l'oxygène pour produire de l'eau et de la chaleur. Cette enzyme permet donc une respiration dite insensible au cyanure qui court-circuite les activités des complexes III et IV. Son activité dépend de nombreux facteurs environnementaux et sa régulation est essentiellement due à son degré d'oxydation ainsi qu'à des effecteurs allostériques (molécule qui par sa liaison avec l'enzyme modifie la vitesse de la réaction) comme le pyruvate.

#### 4-3/L'AOX

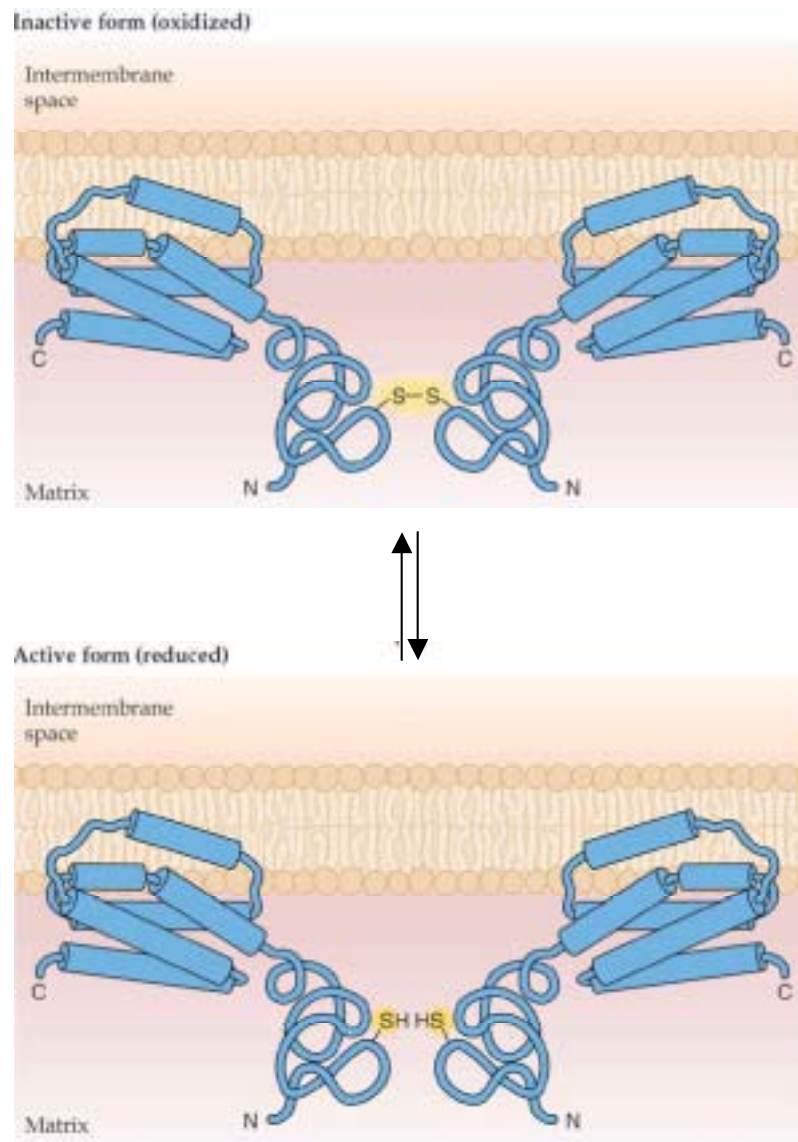
Contrairement aux mammifères, les plantes et quelques autres espèces possèdent une activité respiratoire qui est partiellement résistante au cyanure. Cette caractéristique a été établie depuis la fin des années 20 (Genevois 1929). Cette originalité est due à la présence d'une enzyme qui a été nommée l'alternative oxydase (AOX) (Huq et al. 1978; Rich et al. 1978). Cette enzyme a été retrouvée chez toutes les plantes supérieures examinées à ce jour mais aussi chez de nombreuses algues, champignons, levures et protozoaires. Cette enzyme ne participe pas à la formation du gradient électrochimique de protons nécessaire au fonctionnement du complexe V (Moore et al. 1978), contrairement à la cytochrome c oxydase par exemple. La chaleur dégagée par cette activité a permis d'expliquer certaines caractéristiques des plantes thermogéniques. Ces plantes exploitent ce dégagement de chaleur pour volatiliser des composés attractifs pour les insectes pollinisateurs (Meeuse 1975). Cependant, le fait que cette protéine soit présente dans tout le règne végétal tend à prouver qu'elle possède un rôle physiologique plus général. Il apparaît, par exemple, que la présence de l'AOX est importante dans des conditions où la voie du cytochrome c est altérée (Wagner et al. 1997). Deux hypothèses principales sont émises aujourd'hui pour expliquer le rôle physiologique de l'AOX:

- 1- l'activité AOX permettrait un recyclage rapide du pool d'ubiquinone quand l'activité respiratoire est élevée permettant ainsi aux activités liées au cycle de Krebs de ne plus être limitantes.
- 2- l'activité AOX permettrait de protéger la mitochondrie contre des attaques oxydatives (Vanlerberghe et al. 1997; Wagner et al. 1997). En effet, les plantes subissent des stress environnementaux très sévères liés entre autres à leur immobilité. Une forte activité alternative oxydase dans des conditions où le taux de ROS augmente permet de limiter l'apport de ROS par le complexe III en réduisant la voie du cytochrome c.

L'activité AOX peut être modulée *in vitro* de nombreuses façons. Par exemple, l'activité AOX dans des mitochondries végétales est augmentée significativement après la réduction d'un pont disulfure reliant deux monomères d'AOX (figure 11) (Umbach et al. 1993; Umbach et al. 1994). Cette forme peut être consécutivement activée par des acides  $\alpha$ -cétoniques comme le pyruvate (Millar et al. 1993) qui interagissent avec un groupement sulfhydrylique de l'AOX permettant la formation d'un thiohémiacétal (Umbach et al. 1996). Il est à noter que cette caractéristique d'activation par les acides  $\alpha$ -cétoniques ne se retrouve pas chez l'AOX des champignons (Joseph-Horne et al. 1998; Umbach et al. 2000). Par contre, une activation par des nucléotides de la famille des purines (ADP, AMP et GMP) a pu être observée chez *N. crassa* (Siedow et al. 2000).

L'AOX semble jouer un rôle dans de nombreux processus cellulaires chez les plantes. Par exemple, son activité est stimulée *in vivo* par de nombreux facteurs : inhibition de la voie du cytochrome c (par l'antimycine A par exemple), accumulation d'espèces réactives d'oxygène (lors d'une activité mitochondriale intense), accumulation d'acide citrique (consécutif à l'inhibition de l'aconitase par les ROS) (Verniquet et al. 1991), augmentation de la concentration en acide salicylique (lors d'une réponse hypersensible à une attaque de pathogènes) et faibles températures (Rhoads et al. 1992; Vanlerberghe et al. 1992; Vanlerberghe et al. 1996; Vanlerberghe et al. 1997). L'induction de stress par les facteurs qui stimulent l'activité de l'AOX a conduit à associer son rôle à une défense cellulaire contre les dommages consécutifs à ces stress. De plus, l'altération de l'expression du gène correspondant dans le tapis des anthères de tabac conduit à une stérilité mâle partielle (Kitashiba et al. 1999) révélant le caractère indispensable de cette fonction dans des conditions physiologiques particulières.

Au-delà de leurs fonctions métaboliques essentielles, les mitochondries ont été impliquées dans les processus de mort cellulaire programmée, d'abord chez les animaux (Kroemer et al. 1995; Petit et al. 1997) puis chez d'autres organismes.



**Figure 11**  
Structure et régulation de l'alternative oxydase dans les mitochondries végétales.  
D'après Siedow et al. 2000.



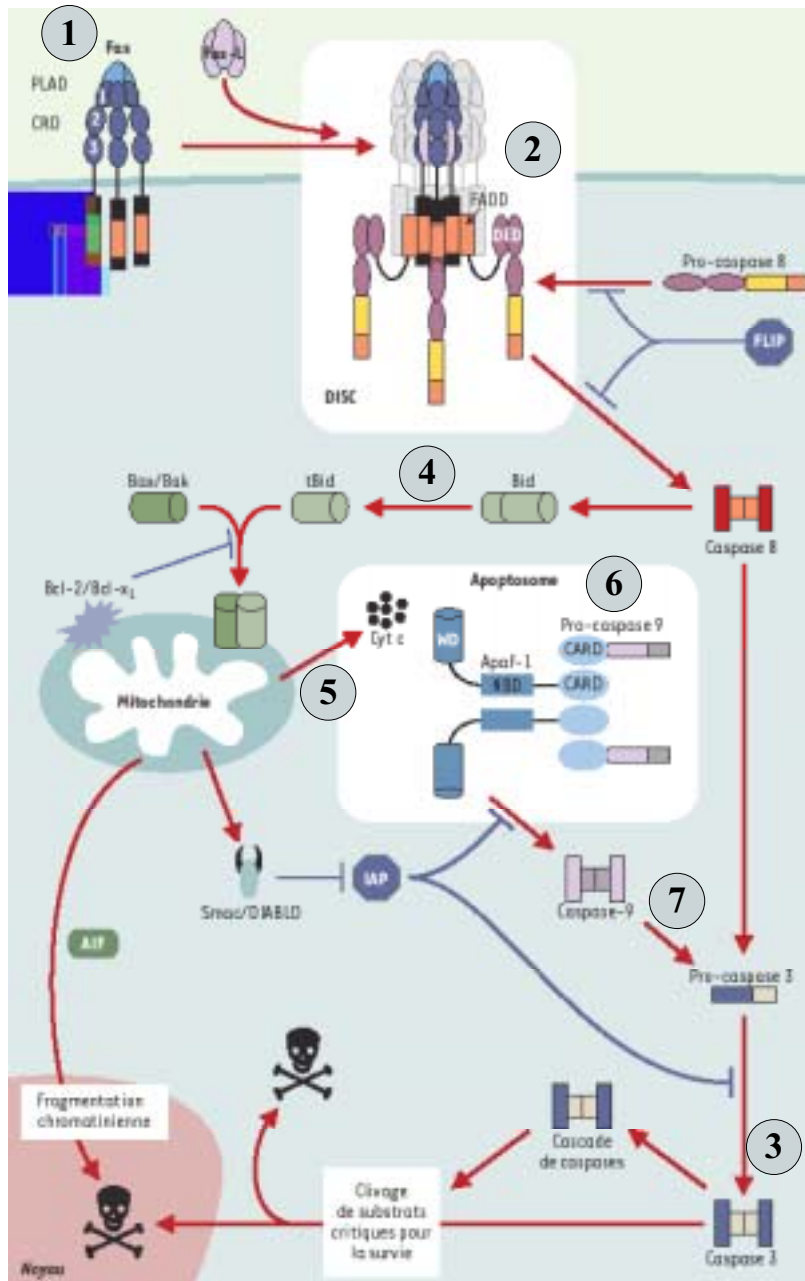
## **II La mort cellulaire programmée et le rôle des mitochondries**

### **1/ Mort cellulaire programmée animale versus mort cellulaire programmée végétale**

Tout au long du cycle de vie des végétaux, différentes phases de développement se succèdent, la morphologie évolue, des modifications cellulaires, biochimiques et moléculaires se produisent. Selon les espèces, ces changements affectent l'organisme entier ou uniquement certaines parties du végétal. La mort cellulaire programmée (MCP) est ainsi une caractéristique essentielle à l'organisation multicellulaire permettant l'élimination de cellules surnuméraires ou endommagées. Nous pouvons citer de nombreux exemples où la MCP fait partie intégrante du développement de la plante ou du mécanisme de réponse à des stress: biogenèse des trichomes, réponse hypersensible à une attaque de pathogènes, formation des vaisseaux de xylème fonctionnel, différenciation cellulaire au niveau de la coiffe racinaire, formation des aérénchymes, sénescence foliaire, dégénérescence de l'albumen et du suspenseur de l'embryon, formation de la mégaspore (Wu et al. 2000). Elle est largement étudiée chez les animaux où des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques ont été dégagées (Jacobson et al. 1997).

Chez les animaux, la MCP est caractérisée par : la condensation du noyau et du cytoplasme, la fragmentation de l'ADN nucléaire et enfin la fragmentation de la cellule en vésicules aboutissant à ce qu'on appelle des corps apoptotiques. Le cœur du système consiste en une cascade protéolytique engendrée par des protéases à cystéines appelées caspases.

Des senseurs de MCP tels que les récepteurs TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) situés à la surface de la cellule sont activés (figure 12). Après transduction du signal par les molécules telles que TRADD (Tumor necrosis factor Receptor Associated Death Domain protein) et FADD (Fas Associated Death Domain protein), des complexes multimériques, comme le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) comprenant notamment la caspase 8, permettent l'activation de la caspase 3. Cette protéine permet le clivage de précurseurs de nucléases comme la CAD (Caspase Activated Deoxyribonuclease). Cette nucléase, une fois activée, va ainsi dégrader l'ADN cellulaire. Cette voie est appelée voie extrinsèque.



**Figure 12**

Schéma général représentant les deux voies principales de déclenchement de la mort cellulaire chez les animaux. L'interaction de la protéine FAS avec son ligand (1), permet le recrutement de FADD et de la procaspase 8 au niveau de la membrane plasmique. Le complexe multiprotéique ainsi formé a été appelé DISC (death-inducing signaling complex) (2). Le rapprochement des procaspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération de la caspase 8 dans le cytosol qui active la caspase 3 (3). Une deuxième voie, déclenchée par le clivage de la molécule BID par la caspase 8 (4), est caractérisée par une perméabilisation des membranes mitochondriales aboutissant au relargage dans le cytosol du cytochrome c (5), qui interagit avec la protéine APAF-1 permettant, en présence d'ATP, le recrutement de la pro-caspase 9, formant ainsi un complexe multiprotéique appelé apoptosome (6), à l'origine de l'activation de la caspase 9, qui activera à son tour la caspase 3 (7).

D'après Couzinet et al. 2002

Il existe également une autre voie appelée voie intrinsèque qui est activée par des stress cellulaires (drogues, dommages à l'ADN). Le complexe DISC va cliver et activer la protéine BID. Cette protéine a pour rôle de permettre le relargage dans le cytosol du cytochrome c habituellement séquestré dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Ce relargage induit la multimérisation de la protéine APAF (Apoptosis protease activating factor). Le complexe composé du cytochrome c, de la protéine APAF, du précurseur de la caspase 9 et de dAMP est appelé l'apoptosome. Sa formation a pour effet de cliver le précurseur de la caspase 9 en une forme active, permettant l'activation de la caspase 3.

Quelle que soit la voie, deux points de régulation du phénomène ont été mis en évidence :

1- Il existe une régulation des caspases par la famille des protéines BLP (Bcl2 Like Protein). Ces protéines situées pour la plupart dans la membrane externe mitochondriale permettent l'activation ou la répression des caspases en provoquant un changement de perméabilité mitochondriale, facilitant ou non le relargage de cytochrome c dans le cytosol (Monaghan et al. 1992; de Jong et al. 1994).

2- l'inhibition des caspases par les protéines de la famille IAP (inhibitor of apoptosis) permet également de moduler la cascade protéolytique par un mécanisme encore inconnu (Hawkins et al. 1996).

Chez les végétaux, la MCP n'a pas lieu telle qu'elle est décrite chez les animaux. Néanmoins certains parallèles peuvent être effectués. On retrouve notamment la fragmentation de l'ADN nucléaire lors d'un stress biotique ou abiotique (Danon et al. 2000). L'existence de caspases végétales reste encore à démontrer mais des activités CLP (caspase like protein) ont pu être détectées. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de caspases animales chez les végétaux permet la suppression de MCP induite par des pathogènes (del Pozo et al. 1998) ou des agents chimiques (De Jong et al. 2000). De plus, des activités CLP ont été retrouvées dans des extraits cellulaires d'orge et sont inhibées spécifiquement par des inhibiteurs de caspase 3 humaine mais pas par des inhibiteurs de protéases à cystéines (Korthout et al. 2000).

L'utilisation de tests d'activités protéolytiques spécifiques de la MCP, comme le clivage de la poly(ADP ribose) polymérase ou PARP par la caspase 3, dans les cellules végétales a permis d'identifier des activités CLP dans des MCP provoquées par un stress oxydant (Sun et al. 1999), par un choc thermique (Tian et al. 2000) ou par des extraits protéiques de pollen lors du phénomène d'autoincompatibilité (Thomas et al. 2004). Cependant, les sites de clivage de la polymérase PARP observés sont différents des sites décrits pour la caspase 3 humaine suggérant qu'il existe des caspases végétales spécifiques. De plus, d'autres CLP comme les métacaspases ou les légumaines ont été identifiées pour la conservation de leur site actif avec les caspases animales mais elles présentent des spécificités de substrat différentes (Chen et al. 1998; Uren et al. 2000).

## **2/ Rôle de la mitochondrie et du cytochrome c**

Chez les animaux, un complexe protéique spécifique de la MCP appelé apoptosome se forme consécutivement au relargage de cytochrome c dans le cytosol (voir la description de la voie intrinsèque de la MCP). Les molécules régulatrices de l'apoptosome sont les BLP. Elles interfèrent avec les caspases ou directement sur la perméabilité mitochondriale. Chez les végétaux, un relargage du cytochrome c a été détecté juste avant l'observation de MCP consécutive à un stress oxydant (Sun et al. 1999), une infection par des agrobactéries (Hansen 2000), un choc thermique (Balk et al. 1999), dans le pollen lors du mécanisme d'autoincompatibilité chez le pavot (Thomas et al. 2004) et lors de la dégénérescence prématurée de l'assise tapétale provoquant la stérilité mâle PET1 chez le tournesol (Balk et al. 2001). Il est à noter qu'une forme de MCP indépendante du relargage de cytochrome c a été observée chez les pétales de fleurs de pétunia après pollinisation (Xu et al. 2000).

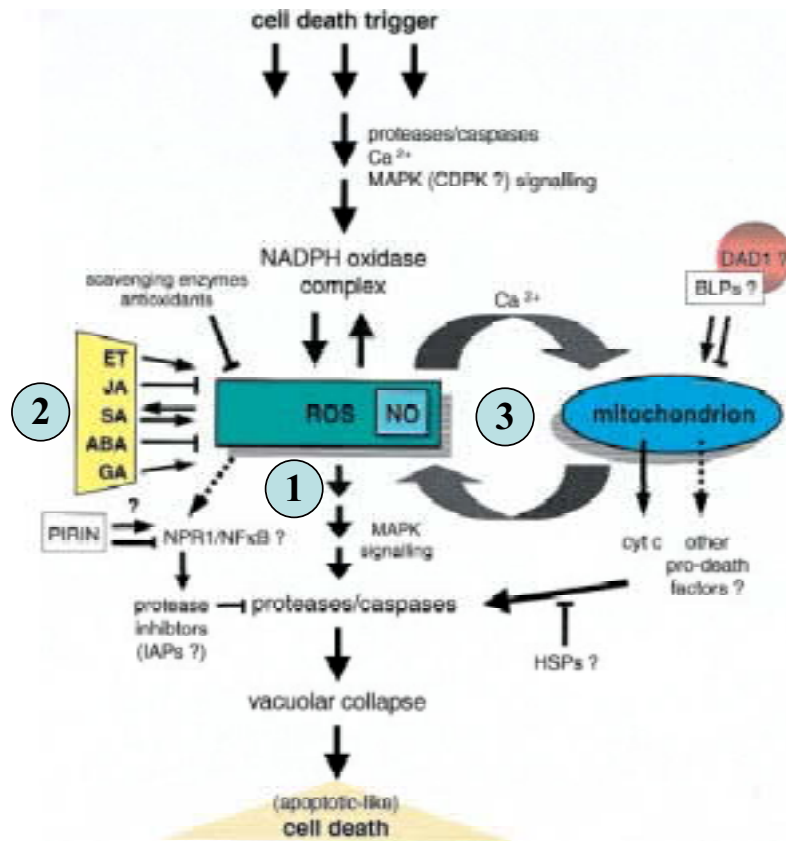
Chez les animaux, plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer le mécanisme de perméabilisation mitochondriale. La principale met en jeu un pore présent dans la membrane interne et dont l'ouverture est régulée par le calcium. Sous l'effet d'une production importante de ROS par le complexe III, le passage de calcium provoque l'ouverture d'un pore transitoire appelé MPT (mitochondrial permeability transition pore) permettant aux molécules de taille inférieure à 1,5 kDa de traverser les membranes interne et externe.

Le gradient électrochimique de protons est alors perdu, ce qui provoque un gonflement de la matrice et donc la rupture de la membrane externe. C'est alors que les composés de l'espace intermembranaire sont rejetés dans le cytoplasme (Petronilli et al. 1994; Bernardi et al. 1999). Ces phénomènes n'ont pas encore été décrits chez les végétaux.

Le relargage de cytochrome c dans le cytosol est donc toujours postérieur à une augmentation de la production de ROS, à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ou une inhibition de la chaîne respiratoire.

### **3/ Rôle des ROS et de l'oxyde nitrique dans la MCP**

Les ROS sont considérées comme des sous produits du métabolisme cellulaire. Il s'agit de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'hydroxyle radicalaire ( $OH^{\bullet}$ ). Elles sont impliquées dans la transduction de signaux de nombreuses voies cellulaires chez les plantes (pour une revue voir Laloï et al. 2004). Dans les tissus végétaux, diverses conditions physiologiques peuvent conduire à des variations très importantes et très soudaines de la quantité de ROS intracellulaire. Le rôle central des ROS dans la MCP végétale (figure 13) a surtout été montré lors de la réponse hypersensible (HR) à une attaque de pathogène (Pontier et al. 1998; Heath 2000). Dans ce cas, le stress oxydant est rapide, transitoire et localisé au site d'infection. La mort des cellules touchées empêche la diffusion de l'infection aux cellules voisines et constitue un mécanisme de résistance. La réponse de la cellule au stress oxydant est modulée en fonction de la concentration en ROS. Si une forte dose de ROS induit la MCP, une faible dose permet la mise en place d'enzymes antioxydantes et l'arrêt du cycle cellulaire (Vranova et al. 2002). Le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire a été bien établi, mais les mécanismes par lesquels ces signaux sont perçus par la cellule restent inconnus. Une étude a montré que le peroxyde d'hydrogène était un activateur potentiel de cascades MAPK (mitogen activated protein kinase) (Kovtun et al. 2000). Ces cascades de kinases induisent l'expression de certains gènes lors d'un stress et répriment les gènes habituellement induits par l'auxine. Ce phénomène d'activation d'une voie de signalisation MAPK dépendante a également été décrit à la suite d'une attaque de pathogène chez *A. thaliana* (Grant et al. 2000) ou lors du processus d'autoincompatibilité chez le pavot (Rudd et al. 2003).



**Figure 13**

Schéma représentant le rôle central des ROS et de l'oxyde nitrique dans la mort cellulaire programmée végétale.

Les ROS sont des signaux importants dans l'activation d'un programme de mort cellulaire chez les plantes (1). Différentes hormones végétales permettent de moduler le taux de ces composés (2). Ce contrôle peut également s'effectuer par des signaux dépendants du calcium mettant en jeu la mitochondrie (3).

ET : éthylène

JA : acide jasmonique

SA : acide salicylique

ABA : acide abscissique

GA : acide gibbérellique

D'après Hoerbericht et al. 2003

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz radical libre dont le rôle dans de nombreuses voies de signalisation comme la régulation du rythme circadien (Golombek et al. 2004) et la réponse aux oestrogènes (Falcone et al. 2002) a été largement caractérisé chez les mammifères. Chez les végétaux, il a été montré qu'une attaque de pathogène provoquait une augmentation du taux de NO suffisante pour induire la MCP à l'aide d'activités CLP (caspase like protein) (Clarke et al. 2000). De plus, il semblerait que le rapport NO/ROS et plus particulièrement NO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit le facteur déclenchant une réponse hypersensible lors d'une attaque de pathogène. En effet, la dismutation de l'ion superoxyde (O<sub>2</sub>•-) en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est strictement requise pour activer la MCP (Delledonne et al. 2001). D'autres travaux ont montré que le NO, tout comme les ROS, permet l'activation de MAPK chez *A. thaliana* et le tabac (Neill et al. 2002). Le NO semble être un effecteur important dans la MCP mais son rôle précis n'a pas été encore décrit.

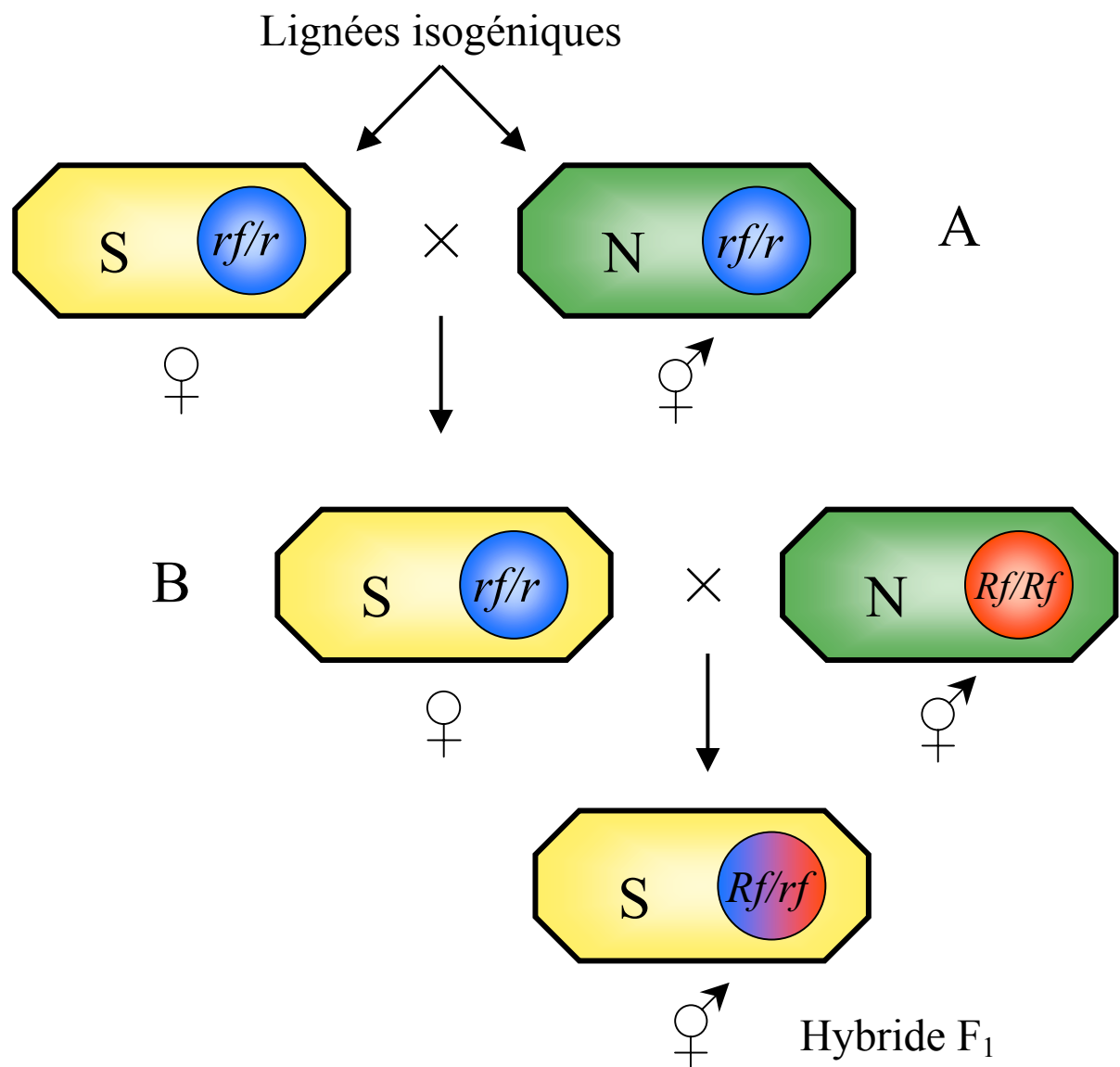
### **III Les stérilités mâles cytoplasmiques**

La stérilité mâle cytoplasmique (SMC) est un caractère à déterminisme nucléocytoplasmique. Le déterminant de la stérilité est à hérédité maternelle et provoque l'absence de pollen fonctionnel. La restauration de la fertilité s'effectue grâce à un déterminant nucléaire. La SMC a été décrite chez plus de 150 espèces végétales (Laser et al. 1972; Mackenzie et al. 1994; Levings et al. 1995). Le plus souvent, elle est retrouvée dans des populations naturelles et la coexistence d'individus mâle stériles et hermaphrodites au sein d'une même population est appelée gynodioécie. La SMC peut également être révélée lors de croisements inter spécifiques ou intra spécifiques (Frank 1989). D'autre part, il a été observé que certaines plantes régénérées issues de fusion de protoplastes pouvaient présenter une SMC (Kumashiro et al. 1988; Rambaud et al. 1993). La stérilité mâle cytoplasmique est largement utilisée pour son intérêt dans la production de semence hybrides (figure 14). Quelle que soit la SMC étudiée, sauf dans le cas particulier de la féverole où la stérilité a été reliée à présence de vésicules membranaires contenant un ARN double brin (Lefebvre et al. 1990), le déterminant de la stérilité mâle a toujours été identifié comme étant un déterminant mitochondrial (Schnable et al. 1998). Sa transmission à la descendance n'est donc pas mendélienne mais uniquement maternelle.

#### **1-/ Utilisation de la SMC en production de semences hybrides**

Les SMC sont fréquemment utilisées afin de produire des semences hybrides. En effet, les hybrides possèdent un avantage par rapport à leurs parents. Ils présentent souvent des performances agronomiques supérieures au meilleur de leur parent. Ce phénomène est appelé vigueur hybride ou hétérosis. Pour exploiter cette vigueur hybride dans la production agricole, il est nécessaire de produire, à grande échelle, des semences issues d'un croisement contrôlé. Les plantes mâle stériles (donc femelles) ne produisent pas de pollen et la fécondation de ces plantes ne peut se faire que grâce à l'apport de pollen par un autre individu. Si des graines sont récoltées sur ces plantes et si le pollinisateur possède un génotype différent de la plante femelle, ce sont à coup sûr des semences hybrides.





**Figure 14**

Utilisation de la SMC en agronomie

A: maintien de la lignée mâle stérile par croisement d'une lignée mâle stérile avec une lignée mainteneuse : croisement permettant la production des graines du parent maternel de l'hybride.

B : restauration de la fertilité par croisement entre une lignée mâle stérile et une lignée restauratrice portant un allèle *Rf* dominant : croisement permettant la production de l'hybride.

S : cytoplasme inducteur de stérilité

N : cytoplasme non inducteur de stérilité

*Rf* : gène nucléaire restaurateur de fertilité (allèle dominant)

*rf* : allèle récessif non restaurateur de *Rf* (mainteur)

La production d'hybrides nécessite donc le maintien de la stérilité mâle d'un des deux géniteurs, c'est-à-dire une production de graines qui donneront les plantes femelles mères de l'hybride dans le champ de production de semences. Afin de produire le parent maternel de l'hybride, les plantes mâle stériles sont pollinisées par le pollen de plantes fertiles de la même variété (même génotype nucléaire) mais possédant un cytoplasme non inducteur de stérilité (variété dite mainteneuse). La totalité des individus issus de ce croisement sera alors mâle stérile, alors qu'une proportion seulement de la descendance le serait si le déterminant de la stérilité était mendélien. Les rétrocroisements successifs entre les plantes mâle stériles et les plantes mainteneuses permettent l'établissement de couples femelles/mainteneurs ayant des génomes nucléaires très proches, voire isogéniques, et un cytoplasme différent.

Dans le cas d'une espèce ou l'hybride est cultivé pour ses graines, la restauration de la fertilité de l'hybride est souhaitable afin de permettre une autofécondation de ces plantes lors de la production agricole. Cette restauration est réalisée si le parent mâle de l'hybride possède un gène de restauration de la fertilité (*Rf*). L'hybride ainsi généré sera hétérozygote pour le gène *Rf* (dominant) et donc mâle fertile malgré son cytoplasme inducteur de stérilité.

## **2-/ Gynodioécie naturelle**

La gynodioécie dans les populations naturelles n'est pas un phénomène rare et représente 7,8% des populations européennes d'angiospermes (Delannay 1978). Cependant, l'étendue du phénomène est variable d'une espèce à l'autre. Le maintien d'une SMC dans une population naturelle reste un paradoxe. En effet, alors que les individus hermaphrodites transmettent leurs gènes nucléaires par les voies mâles et femelles, les individus mâle stériles ne les transmettent que par la voie femelle. Ceci constitue donc une nette diminution de la valeur sélective des gènes nucléaires associés au cytoplasme inducteur de stérilité. Une explication articulée autour de 3 éléments peut alors être avancée :

1- Le déterminisme nucléocytoplasmique de la stérilité mâle comporte des facteurs stérilisants cytoplasmiques et des facteurs nucléaires de restauration de la fertilité mâle.

2- Les plantes femelles produisent plus de graines que les hermaphrodites. C'est ce qu'on appelle l'avantage femelle : les individus mâle stériles, ne produisant pas de gamètes mâles, disposent de plus de ressources pour produire des gamètes femelles et ainsi produisent plus de graines que les individus hermaphrodites. Ceci permet au cytoplasme inducteur de stérilité de se maintenir, voire de se propager dans la population (Atlan et al. 1992).

3- Il existe un coût de la restauration : le phénomène de restauration de la fertilité engendre un coût énergétique substantiel pour l'individu conduisant à une contre sélection des plantes porteuses du gène de restauration et du cytoplasme non inducteur de la stérilité dans la population (Couvét et al. 1998).

Au vu de ces données, les SMC apparaissent moins comme le résultat d'un dysfonctionnement mitochondrial que comme une caractéristique du mode de reproduction chez différentes espèces. Elles peuvent donc être considérées comme un conflit entre deux génomes qui possèdent des modes de transmission à la descendance différents (Saumitou-Laprade et al. 1994; Saur Jacobs et al. 2003). L'apparition du gène de stérilité facilite la transmission du génome mitochondrial qui le porte en augmentant la descendance par la voie femelle puis le génome nucléaire contrecarre l'effet de la mitochondrie pour rétablir la voie mâle.

### **3-/ Les gènes de SMC**

Les gènes de SMC identifiés à ce jour sont tous différents en séquence d'un système à l'autre et ne présentent pas d'homologies à part deux exceptions :

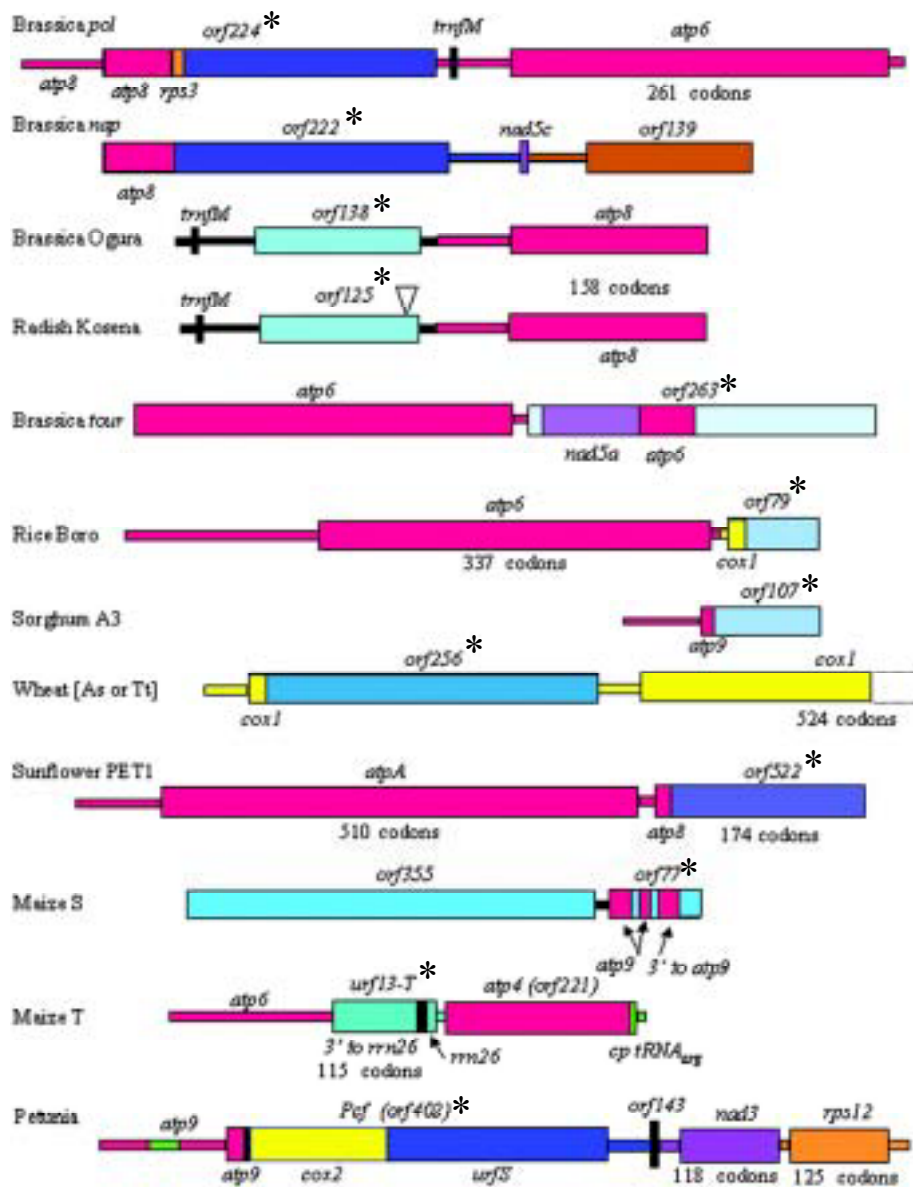
1- Chez *Brassica napus*, l'*orf222* responsable de la SMC *nap* et l'*orf224* responsable de la SMC *polima* possèdent une identité de 79% au niveau nucléotidique (L'Homme et al. 1997).

2- Chez les céréales, l'*orf79* responsable de la SMC *Bo* du riz et l'*orf107* du cytoplasme de type A3 responsable d'une SMC chez le Sorgho possèdent une identité protéique de 53% (Tang et al. 1996).

Tous les gènes responsables de SMC peuvent être considérés comme des *orf* chimériques résultant des nombreuses recombinaisons du génome mitochondrial. La plupart du temps, il existe au moins une partie du gène qui peut être identifiée comme provenant d'autres séquences mitochondriales (codantes ou non codantes) (figure 15) (Budar et al. 2003; Hanson et al. 2004). Ces séquences peuvent constituer la majorité de la séquence codante du gène de CMS comme pour le gène *T-urf13* chez le maïs (Dewey et al. 1987) ou une infime partie comme pour le gène *orf138* chez la SMC Ogura des *Brassica* (Bellaoui et al. 1998).

Une autre caractéristique commune de ces gènes est qu'ils sont cotranscrits avec un gène mitochondrial essentiel. La présence de transcrits polycistroniques a été identifiée dans toutes les SMC observées jusqu'à aujourd'hui. Ces derniers coexistent parfois avec des monocistrons du gène "partenaire" (Laver et al. 1991). Ce recrutement de gènes mitochondriaux essentiels ne reflète pas seulement une utilisation des signaux d'expression de ces gènes, mais également une contrainte : si les gènes responsables de SMC ne sont pas associés à des gènes essentiels leur maintien dans le génome mitochondrial est menacé (Bellaoui et al. 1998). Cette contrainte représente une caractéristique essentielle du maintien de la SMC dans les populations naturelles (Budar et al. 2001).

Les polypeptides codés par ces gènes sont, la plupart du temps, présents dans tous les tissus de la plante, ce qui peut probablement s'expliquer par la nécessité de générer dans tous les types cellulaires les produits des gènes essentiels. Les protéines de SMC sont généralement associées aux membranes mitochondriales (Hanson et al. 2004). L'apparition et le maintien des SMC dans la nature sont probablement dépendants du fait que les gènes responsables de ce phénomène ne provoquent pas d'effet pléiotrope sur les tissus végétatifs des plantes mâle stériles. L'expression constitutive des protéines de stérilité associée à l'absence d'effet délétère pléiotrope, limitent alors les mécanismes physiologiques envisageables pour induire la stérilité mâle dans un système capable de se maintenir en population naturelle.



**Figure 15**

Rprésentation schématique des différents gènes chimériques responsables de SMC. Les gènes responsables de SMC sont marqués d'un astérisque. Ils sont représentés avec le gène mitochondrial avec lequel ils sont cotranscrits. La couleur rose est utilisée pour les gènes codant des sous unités de l'ATP synthase ou des fragments de ces gènes. Les différentes couleurs bleues sont utilisées pour les régions ne présentant pas d'homologies avec des séquences codantes mitochondriales. La couleur jaune est utilisée pour les gènes codant des sous unités de la cytochrome oxydase ou des fragments de ces gènes. La couleur orange est utilisée pour les gènes codant des protéines ribosomiques. Les différentes teintes de bruns sont utilisées pour les séquences conservées dans plusieurs génomes mitochondriaux végétaux. La couleur verte est utilisée pour les séquences provenant de génomes chloroplastiques.

D'après Hanson et al. 2004

Le(s) mécanisme(s) des SMC reste(nt) encore inconnu(s) mais ils sont la conséquence de conflits génomiques. Les gènes mitochondriaux responsables de SMC sont issus de recombinaisons du génome mitochondrial et leur expression est la plupart du temps constitutive. Leur action est cependant restreinte à certaines assises cellulaires et leur effet ne conduit qu'à l'absence de gamètes mâles fonctionnels dans la quasi totalité des cas. Les mécanismes impliqués dans les diverses SMC étudiées jusqu'aujourd'hui sont probablement différents, mais s'ils concernent une SMC maintenue en population naturelle, ils doivent alors répondre à ces contraintes.

#### **4-/ Exemples détaillés de quelques SMC**

Quatre exemples de SMC sont ici présentés : la SMC Texas chez le maïs, la SMC IS112C chez le sorgho, la SMC PET1 chez le tournesol et la SMC *G* chez la betterave. Ces exemples font partie des SMC les plus étudiées et les données recueillies sur ces systèmes sont, à mon sens, représentatives des différentes hypothèses évoquées à ce jour pour expliquer les stérilités mâles.

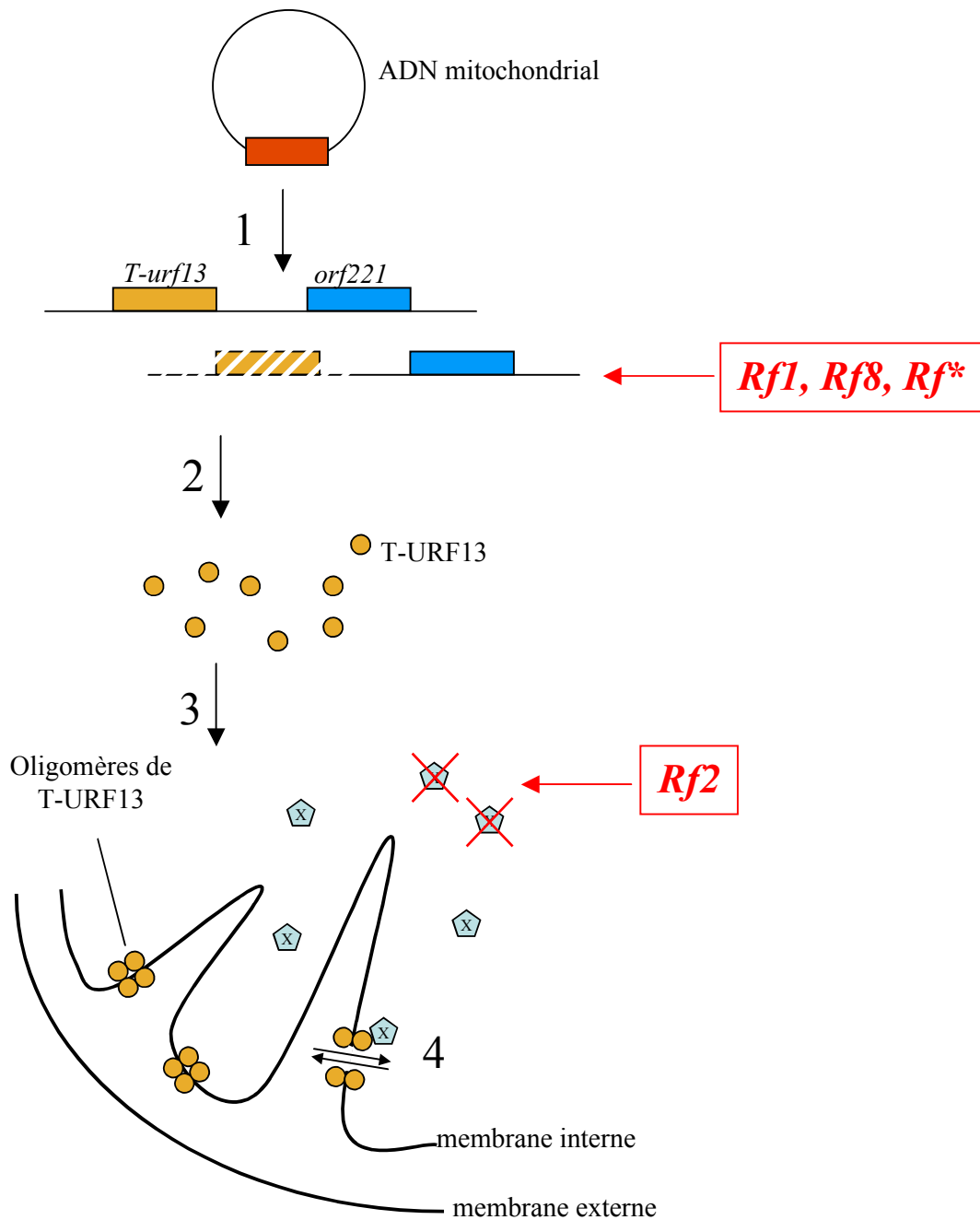
##### **4-1/ La SMC Texas chez le maïs**

La première description de cette SMC a été effectuée en 1952 par Rogers et Edwardson (Rogers et al. 1952) et c'est aujourd'hui la SMC la mieux connue et la plus étudiée (pour une revue voir Wise et al. 1999). Le cytoplasme T (pour Texas) confère non seulement la SMC mais aussi la sensibilité à des toxines de champignons, comme la toxine de *Bipolaris maydis* (BmT) et la toxine de *Phyllosticta maydis* (PmT), et à un insecticide (le méthomyl). La comparaison des profils d'expression protéique entre mitochondries issues d'individus fertiles et stériles a permis l'identification d'une protéine de 13kDa appelé T-URF13 (Texas Unknown Reading Frame 13 kDa) et spécifique du cytoplasme stérile (Forde et al. 1978). Cette protéine est codée par un gène mitochondrial chimérique composé de la partie 3' non codante de l'ARN ribosomique 26S, de 9 codons d'origine inconnue et d'une partie de la région codante de l'ARN ribosomique 26S (Dewey et al. 1987; Wise et al. 1987). Le gène *T-urf13* est cotranscrit avec l'*orf221* identifiée comme codant une protéine spécifique de la mitochondrie végétale (Dewey et al. 1986; Prioli et al. 1993).

La protéine T-URF13 est localisée dans la membrane interne mitochondriale et s'associe en oligomères (Korth et al. 1991). Il est à noter que tous les travaux de topologie moléculaire, d'association à la membrane ainsi que l'étude des interactions avec les toxines de champignons ont été menés par expression hétérologue de la protéine chez *Escherichia coli* (Matthews et al. 1979; Bervillé et al. 1984; Holden et al. 1985). Chaque monomère de la protéine T-URF13 est constitué de trois hélices  $\alpha$  dont deux sont amphiphiles. L'association de six à huit monomères permettrait la formation d'un pore. Il est maintenant établi que la toxine de *Bipolaris maydis* interagit spécifiquement avec la protéine T-URF13 conduisant à l'altération du potentiel membranaire mitochondrial par l'ouverture de ce pore (Rhoads et al. 1994).

Il est possible de détecter la protéine dans tous les tissus de la plante, mais son effet reste, en absence de toxine, essentiellement localisé et aboutit à l'absence de grain de pollen fonctionnel (Newton et al. 1985). Une des principales hypothèses avancées aujourd'hui est qu'un facteur encore inconnu "X" spécifique des tissus de l'anthere et similaire à la toxine BmT viendrait se fixer sur le pore formé par T-URF13. Cette association provoquerait son ouverture aboutissant à la destruction du potentiel électrochimique de protons et ainsi à la mort cellulaire (figure 16).

Plusieurs gènes de restauration ont été identifiés chez le maïs : *Rf1* (Wise et al. 1996), *Rf8*, *Rf\** (Dill et al. 1997) et *Rf2* (Cui et al. 1996). La restauration du phénotype mâle fertile nécessite la présence des gènes *Rf1* (ou *Rf8* ou *Rf\**) et *Rf2*. Les gènes *Rf1*, *Rf8* et *Rf\** affectent chacun le profil de transcription du gène *T-urf13* d'une façon différente, mais conduisant tous à la diminution de la quantité de transcrits. L'effet le plus drastique est celui du gène *Rf1* qui permet une diminution de 80% de la quantité de transcrits du gène *T-urf13* dans les tissus végétatifs (Kennell et al. 1989). *Rf2* code une aldéhyde déshydrogénase et est le seul gène de restauration cloné à ce jour chez le maïs (Cui et al. 1996; Liu et al. 2001). Cette protéine jouerait un rôle important dans la détoxification des intermédiaires de réaction issus de la fermentation alcoolique comme l'acétaldéhyde dans les anthères. Cette donnée permet de suggérer que le composé X soit l'acétaldéhyde. L'action de la protéine RF2 empêcherait donc la fixation de l'acétaldéhyde sur la protéine T-URF13 permettant de garder l'intégrité mitochondriale pendant la gamétogenèse. *Rf2* joue probablement un autre rôle dans le fonctionnement cellulaire car il est retrouvé dans la quasi totalité des lignées de maïs (Schnable et al. 1994) et est indispensable pour la fertilité mâle de plantes sur cytoplasme non inducteur de stérilité (Liu et al. 2001).



**Figure 16**

Schéma des mécanismes moléculaires proposés pour la SMC Texas et sa restauration

Le gène *T-urf13* est cotranscrit avec l'*orf221* (1), puis traduit (2). La protéine T-URF13, associée en oligomères dans la membrane interne mitochondriale (3) forme un pore. Dans les tissus végétatifs ce pore reste fermé alors que dans les tissus reproducteurs un composé "X" inconnu mais spécifique des anthères provoque l'ouverture du pore(4). Cette ouverture conduit à la perte du gradient électrochimique. La restauration réduit la quantité de transcrit *T-urf13* (*Rf1*, *Rf8*, *Rf\**) et réduit l'accumulation du composé "X" (*Rf2*).

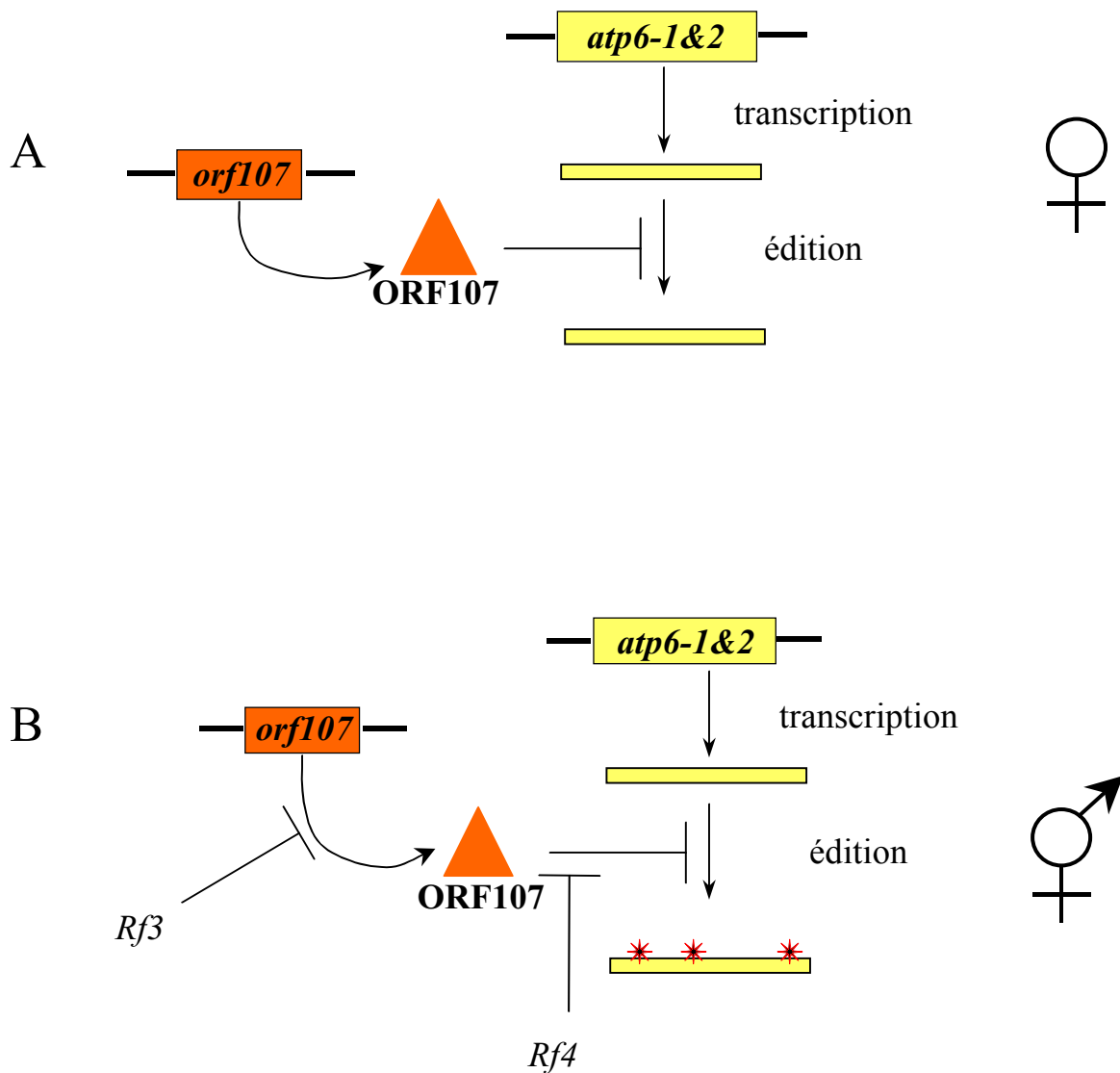
D'après Korth et al. 1991 ; Rhoads et al. 1994.



Il est à noter que les autres gènes de restauration clonés à ce jour chez le pétunia, le radis et le riz sont des gènes codant des protéines à motifs PPR (pentatricopeptide repeat) qui affectent l'expression des gènes mitochondriaux (Bentolila et al. 2002; Brown et al. 2003; Desloire et al. 2003; Kazama et al. 2003; Koizuka et al. 2003; Akagi et al. 2004). Le rôle des protéines à motifs PPR est cohérent avec l'évolution du système tel qu'elle est établie dans les modèles théoriques mais ne permet pas d'acquérir de nouvelles informations sur le mécanisme de stérilité. *Rf2* est, à ce jour, le seul gène de restauration qui permette d'établir un lien entre le mécanisme de la SMC et sa restauration.

#### 4-2/ La SMC IS112C chez le sorgho

Plus de 7 SMC différentes ont été identifiées chez le sorgho (Worstell et al. 1984; Pring et al. 1995; Xu et al. 1995). Une SMC du groupe SMC A3, la SMC IS112C, est celle qui est la mieux caractérisée d'un point de vue moléculaire. L'analyse et la comparaison des profils d'ADN mitochondriaux d'individus stériles et fertiles a permis de révéler l'existence de plusieurs *orf* additionnelles chez les plantes stériles (Tang et al. 1996). Une d'entre elles (*orf107*) présente un profil de transcription différent en fonction du contexte nucléaire mainteneur ou restaurateur (Tang et al. 1996). L'*orf107* code une protéine de 12 kDa. Une des autres caractéristiques de ce cytoplasme est la présence de deux copies réarrangées de l'*atp6* appelées *atp6-1* et *atp6-2*. Dans les plantes mâle stériles, les deux transcrits issus de ces gènes présentent un degré d'édition très faible voire nul dans les anthères (Howad et al. 1997). Dans les plantes restaurées, la fréquence d'édition de ces transcrits est directement corrélée au taux de gamètes mâles viables (Pring et al. 1999). Chez l'homme, les protéines orthologues à celles issues de transcrits *atp6* non édités sont responsables de graves maladies mitochondriales comme des maladies neurodégénératives (Kempken et al. 1998). La présence de ces protéines "aberrantes" dans les anthères n'a pas été démontrée. Le lien entre la SMC, l'*orf107*, l'*atp6-1* et l'*atp6-2* n'est pas encore formellement établi. Cependant, deux gènes de restauration ont pu être identifiés, *Rf3* et *Rf4*. Ces deux gènes agissent respectivement sur le profil de transcription et sur l'accumulation des ARN messagers l'*orf107* (Tang et al. 1998) et sur l'édition des ARN messagers des gènes *atp6* spécifiquement dans les anthères (Howad et al. 1997; Pring et al. 1998). Un modèle a été proposé par Howad en 1999 (Howad et al. 1999) (figure 17), où l'ORF107 empêche l'édition de l'*atp6* spécifiquement dans les anthères et provoque ainsi un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire conduisant à la stérilité.



**Figure 17**

Schéma des mécanismes moléculaires proposés pour la SMC IS112C du Sorgho et sa restauration.

A : La protéine codée par l'*orf107* empêche l'édition des transcrits *atp6* conduisant à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire dans l'anthere ce qui provoque la stérilité mâle.

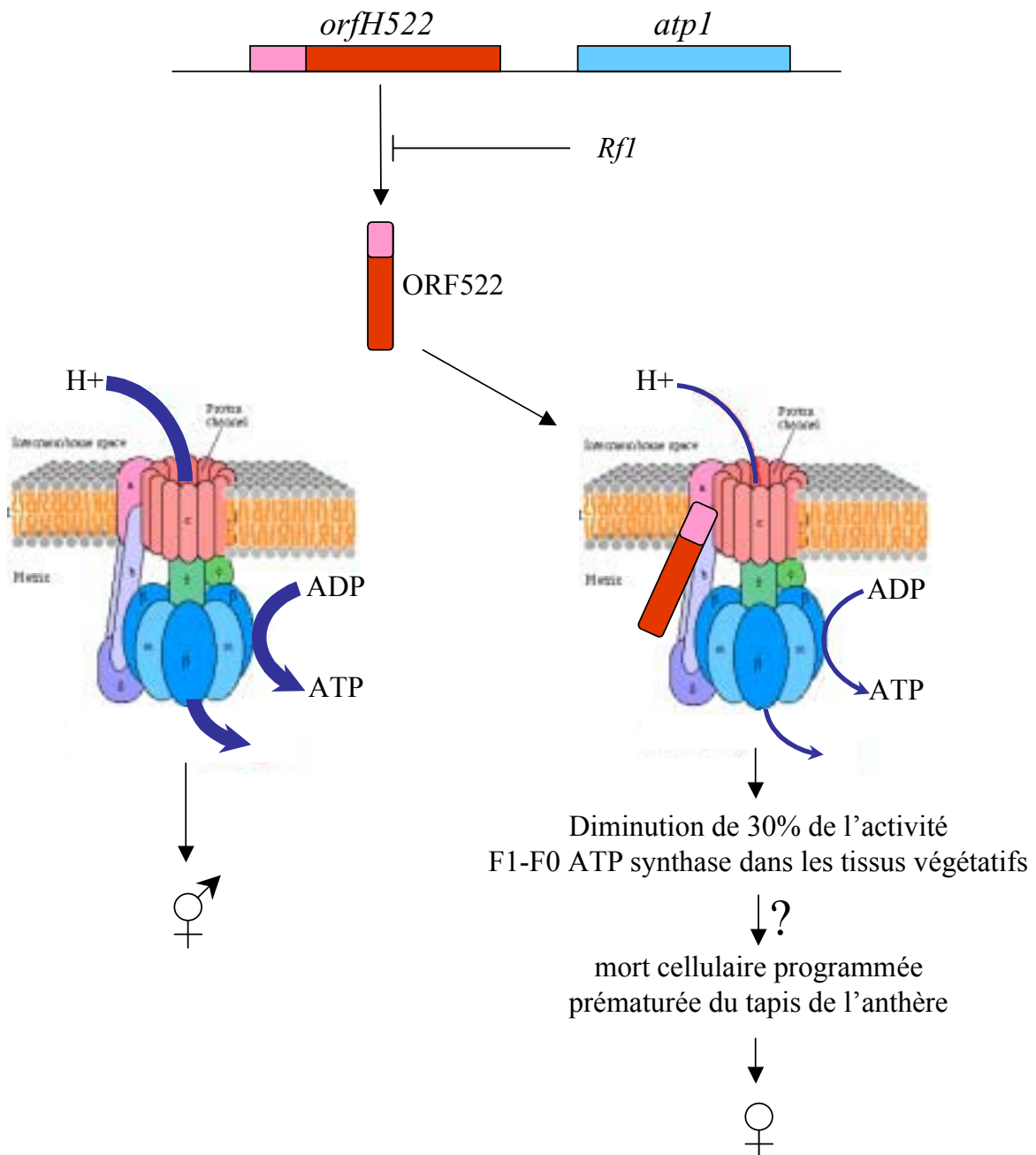
B : *Rf3* clive les transcrits de l'*orf107* réduisant ainsi la présence de la protéine ORF107. L'action du gène *Rf4* permet l'édition des transcrits *atp6* dans l'anthere rétablissant le fonctionnement normal de la chaîne respiratoire.

D'après Howad et al. 1999

#### 4-3/ La SMC PET1 chez le tournesol

La SMC PET-1 a été identifiée lors d'un croisement entre deux espèces de tournesol : *Helianthus annuus* et *Helianthus petiolaris* (Leclercq 1969). La comparaison des génomes mitochondriaux de lignées isogéniques portant soit le cytoplasme d'*H. annuus* soit celui d'*H. petiolaris* a permis d'identifier des modifications dans une région de 17 kb autour du gène codant pour la sous-unité  $\alpha$  de l'ATPase (*atp1*). Cette région comprend une inversion de 12 kb et une insertion de 5 kb. Ces modifications touchent la région 3' du gène *atp1* donnant naissance à une nouvelle *orf* : l'*orfH522* (Kohler et al. 1991; Laver et al. 1991). Cette *orf* est cotranscrite avec l'*atp1* et ses 18 premiers codons sont homologues à l'*orfB* alors que le reste de la séquence codante est d'origine inconnue (Laver et al. 1991). L'*orfH522* code une protéine de 15 kDa (Monéger et al. 1994) intrinsèque aux membranes mitochondriales (Horn et al. 1996). La présence de la protéine ORFH522 dans le tapis conduirait à un relargage anticipé du cytochrome c dans le cytosol lors du développement de l'assise induisant alors un programme de mort cellulaire prématuré (Balk et al. 2001). Cette MCP apparaissant alors que la maturation des grains de pollen n'est pas achevée conduirait alors à la stérilité mâle. Il a également été démontré que l'activité ATPase du complexe V était diminuée d'environ 30 % dans des extraits mitochondriaux de plantules de tournesol mâle stérile (Sabar et al. 2003). Cette diminution est spécifique du complexe V et n'affecte pas les autres complexes respiratoires. Une des principales hypothèses avancée aujourd'hui, par les auteurs, pour expliquer cette diminution est que la protéine ORFH522 (comportant 18 résidus de l'ORFB en position N-terminale) entre en compétition avec la protéine ORFB dans l'assemblage ou le fonctionnement du complexe F1-F0-ATPase (figure 18). Cette compétition conduirait ainsi à l'incapacité de la chaîne respiratoire à fournir l'énergie nécessaire lors du développement de l'anthere. Cette déficience déclencherait alors l'activation d'un programme de mort cellulaire anticipé dans les cellules tapétales.

La restauration de la fertilité est sous le contrôle d'un gène dominant *Rf1*. Ce gène semble agir à un niveau post-transcriptionnel et spécifiquement dans les fleurs au stade méiocyte, en déstabilisant le cotranscrit *orfH522-atp1* aboutissant à la très forte diminution de l'abondance de la protéine ORFH522 dans les boutons floraux (Monéger et al. 1994; Smart et al. 1994).



**Figure 18**

Schéma des mécanismes moléculaires proposés pour la SMC PET1 du tournesol

La protéine ORFH522 contient une extrémité N terminale identique à l'ORFB et sa présence au sein du complexe F1-F0 ATPase engendre une diminution de son activité qui serait délétère dans l'assise tapétale, conduisant à une mort cellulaire programmée anticipée. La restauration s'effectue par le produit du gène *Rf1* qui déstabilise le cotranscrit *orfH522-atp1* aboutissant à la réduction de l'abondance de la protéine ORFH522.

#### 4-4/ La SMC G chez la betterave

Au moins trois cytoplasmes inducteurs de stérilité ont été identifiés dans des populations gynodioïques de betterave et sont nommés *E*, *G* et *H* (Cuguen et al. 1994). Le cytoplasme *G* est néanmoins le mieux caractérisé aujourd'hui. Deux polypeptides mitochondriaux modifiés peuvent être identifiés chez les plantes porteuses de ce cytoplasme. Il s'agit de la protéine NAD9 qui appartient au complexe I de la chaîne respiratoire et de la protéine COX2 qui appartient au complexe IV (Ducos et al. 2001). La sous-unité NAD9 des mitochondries du cytoplasme *G* possède une extension C-terminale de 14 acides aminés et 5 substitutions dans sa séquence et est appelée *grande-NAD9*. La sous-unité COX2 porte une troncature C-terminale et est appelée *petite-COX2*. Le polypeptide *grande-NAD9* est assemblé dans le complexe I, et l'instabilité de ce complexe a été observée lors d'électrophorèse en conditions natives (expériences de Blue Native PAGE). Cette instabilité ne semble pas affecter l'activité du complexe I dans les tissus végétatifs. Par contre, l'activité du complexe IV contenant le polypeptide *petite-COX2* est diminuée de moitié *in vitro*. Cette diminution ne conduit à aucun phénotype visible au niveau végétatif car elle semble être compensée par une surexpression de l'AOX (Ducos et al. 2001). Il semble donc que ces dysfonctionnements de la chaîne respiratoire soient compensés dans les tissus végétatifs mais pas dans les tissus reproducteurs, conduisant à l'absence de gamètes mâles fonctionnels. Des études pour caractériser l'étendue de ces dysfonctionnements mitochondriaux ainsi que l'avantage sélectif potentiel assurant le maintien de la SMC en milieu naturel sont encore nécessaires pour une bonne compréhension de ce système.

## IV La SMC Ogura

### 1-/ Mise en évidence de SMC Ogura chez *Raphanus sativus*

La SMC Ogura a été décrite pour la première fois par le Dr Ogura en 1968 (Ogura 1968) chez une variété asiatique de radis (*Raphanus sativus*). C'est, à l'époque, un des premiers cas de SMC décrits chez la famille des *Brassica*. Les observations cytologiques réalisées en 1968 sur les plantes de radis mâle stériles ont montré que les cellules sporogènes présentaient un développement normal jusqu'à la méiose mais que les microspores avortaient à un stade précoce. Il a également été observé une dégénérescence prématurée de l'assise tapétale – tissu nourricier des futurs grains de pollen. C'est très probablement ce phénomène qui conduit à l'avortement des microspores.

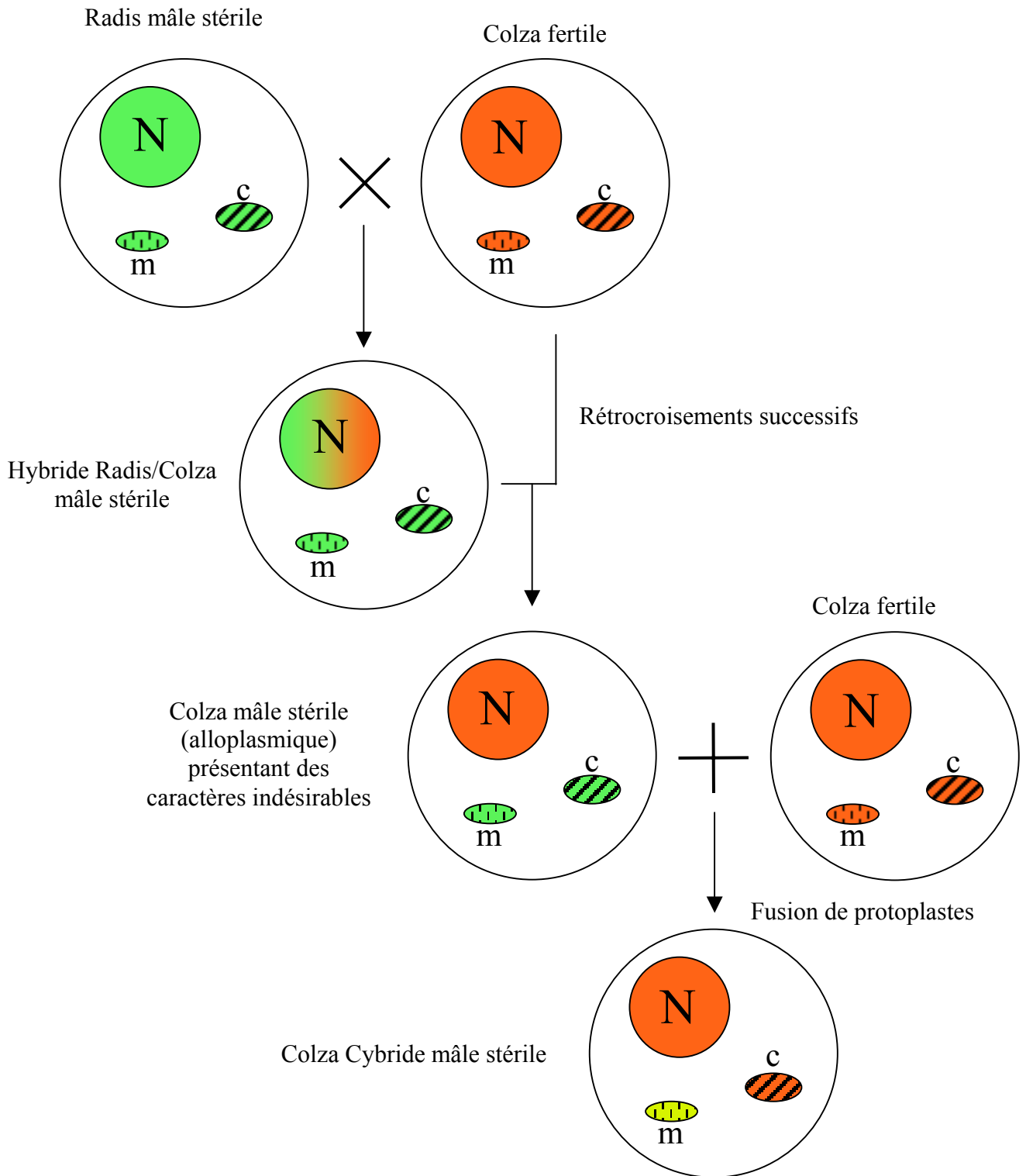
Cette SMC a été ensuite introduite dans des variétés européennes de radis (Bonnet 1975; Bonnet 1977). Ce transfert a notamment permis de révéler l'existence de plusieurs gènes de restauration de la fertilité dans les génotypes européens.

### 2-/ Transfert de la SMC Ogura dans la famille des *Brassica* cultivées

Les sélectionneurs de chou et de colza recherchaient un système fiable de production de semences hybrides dans ces espèces et ont entrepris le transfert de la SMC Ogura, dans ces *Brassica* cultivées, par des croisements interspécifiques (figure 19).

#### 2-1/ Création de lignées alloplasmiques de *Brassica* porteuses du cytoplasme Ogura

Des croisements entre des plantes de radis mâle stériles et des lignées de chou (*Brassica oleracea*) et de colza (*Brassica napus*) ont été réalisées. De nombreux rétrocroisements ont été effectués afin de rétablir le contexte nucléaire *Brassica* (Bannerot et al. 1974) conduisant à la création de lignées alloplasmiques mâle stériles (noyau *Brassica* sur cytoplasme radis).



**Figure 19**

Transfert de la stérilité mâle du radis vers les *Brassica* par croisements puis par fusion de protoplastes

N : noyau

m : mitochondrie

c : chloroplaste

Ces lignées présentaient néanmoins de nombreux défauts comme une déficience en chlorophylle à basse température, la faible production de nectar et une fertilité femelle altérée, les rendant difficilement utilisables pour la production de semences hybrides (Bannerot et al. 1977). Ces défauts sont sûrement dus à la situation d'alloplasmie, les interactions entre le cytoplasme de radis et le noyau de *Brassica* induisant des dysfonctionnements chloroplastiques et mitochondriaux.

### 2-2/ Amélioration des lignées alloplasmiques par fusion de protoplastes

Des fusions de protoplastes ont été entreprises, afin d'éliminer ces caractères délétères des lignées alloplasmiques tout en conservant la stérilité mâle (Pelletier et al. 1983). Ces fusions ont été effectuées entre des protoplastes issus d'une lignée alloplasmique mâle stérile de colza et des protoplastes issus d'une lignée de colza fertile utilisée lors des croisements. Parmi les plantes obtenues après régénération (appelées cybrides), les plantes mâle stériles ne présentant plus les caractères indésirables ont été sélectionnées. L'analyse des profils d'ADN chloroplastique a permis de montrer qu'il n'y avait pas eu de recombinaison entre les génomes parentaux et que l'on retrouvait chez les plantes mâle stériles le génome chloroplastique du parent fertile (Pelletier et al. 1983). Par contre, de nombreuses différences entre les génomes mitochondriaux des cybrides ont été observées suggérant qu'un grand nombre d'événements de recombinaison avaient eu lieu entre les génomes parentaux (Vedel et al. 1986). Des observations cytologiques réalisées sur des anthères de cybrides mâle stériles ont montré que le phénotype était similaire à celui observé chez le radis (Gourret et al. 1992). De plus, aucune altération de la morphologie florale ainsi qu'aucun effet pléiotrope sur les parties végétatives n'ont pu être observés. Des mesures d'activités respiratoires et photosynthétiques ont également été réalisées sur des explants foliaires et aucune différence n'a pu être détectée entre les lignées fertiles et les cybrides mâle stériles (Farineau et al. 1990).



### **3-/ Identification du gène responsable de la SMC Ogura**

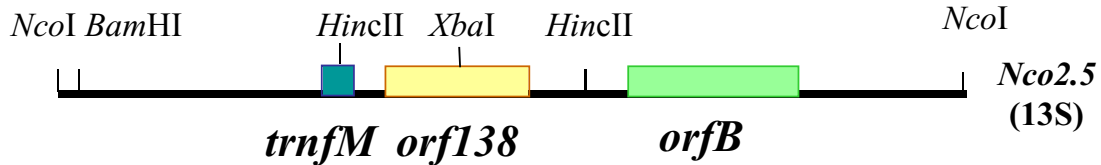
La comparaison des profils de restriction d'ADN mitochondrial des cybrides obtenus a montré que de nombreuses différences pouvaient être observées (Chétrit et al. 1985; Vedel et al. 1986; Vedel et al. 1987). Un de ces cybrides présentait un comportement original. En effet, une forte proportion de sa descendance montrait une réversion vers la fertilité, interprétée comme une instabilité de son génome mitochondrial. Ce phénomène a facilité l'identification de la région génomique responsable de la SMC. C'est ainsi qu'un fragment d'ADN mitochondrial de 2,5 kb bordé par 2 sites *NcoI* (appelé Nco2.5) présent chez le cybride mâle stérile et absent chez les révertants fertiles a pu être identifié (Bonhomme et al. 1991). Ce fragment a été cloné puis séquencé. Il présente un gène codant un ARNt formyl-méthionine et deux *orf* (figure 20A) (Bonhomme et al. 1992). Une *orf* compte 158 codons et est l'*orfB* récemment identifiée comme codant une sous-unité de la F1-F0 ATP synthase (Heazlewood et al. 2003; Sabar et al. 2003). L'autre *orf* possède 138 codons et a été appelée *orf138*. L'absence de transcrite de l'*orf138* chez les révertants fertiles a confirmé la corrélation entre l'*orf138* et la SMC Ogura (Bonhomme et al. 1991; Bonhomme et al. 1992).

De plus, il a été confirmé que l'*orf138* était responsable de la stérilité Ogura chez le radis (Krishnasamy et al. 1993). Il existe également une autre SMC chez le radis, appelée kosena où le déterminant identifié de la stérilité est l'*orf125* (Iwabuchi et al. 1999). Il s'agit d'un gène mitochondrial homologue à l'*orf138* puisqu'il ne diffère que par une délétion de 39 paires de bases dans la région 3' du gène. Les auteurs ont pu montrer que l'expression du gène ainsi que l'accumulation de la protéine correspondante étaient similaires à ceux de l'*orf138*.

La caractérisation de la protéine ORF138 a permis de montrer que c'est une protéine mitochondriale de 19 kDa présente dans tous les tissus analysés et qu'elle est intrinsèque aux membranes mitochondriales (Grelon et al. 1994).

Des travaux plus récents, effectués sur des populations sauvages et de cultivars de radis mais aussi dans des collections botaniques de *Raphanus raphanistrum* ont permis d'identifier 8 variants naturels de l'ORF138 parmi lesquels l'ORF125 (figure 20B) (Yamagishi et al. 2001). Les autres variants comportent 1 ou 2 changements d'acides aminés par rapport à la séquence originellement décrite. Pour au moins 4 de ces types, la capacité à induire une stérilité mâle a été vérifiée.

A



B

ORF138	MITFFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFLLAFLLLMAHIWLSWFSNN
C	MITFFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFLLA <b>Y</b> LLMAHIWLSWFSNN
D	MI <b>P</b> FFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFLLAFLLLMAHIWLSWFSNN
E	MI <b>P</b> FFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFLLA <b>Y</b> LLMAHIWLSWFSNN
F	MITFFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFLLAFLLLMAHIWLSWFSNN
G	MITFFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFL <b>F</b> AFLLLMAHIWLSWFSNN
H	MITFFEKLSTFCHNLTPTTE <b>C</b> QVSVISFFLLAFLLLMAHIWLSWFSNN
I	MITFFEKLSTFCHNLTPTTECKVSVISFFLLA <b>Y</b> LLMAHIWLSWFSNN
ORF138	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
C	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
D	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
E	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
F	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
G	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
H	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKTIKSNVPNDEVTKKV SPI
I	QHCLRTMRHLEKCLKIPYE FQYGLGVKITIKSNVPNDEVTKKV SPI
ORF138	IKGEIEGKEEKKEGKGEI EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK
C	IKGEIEGKEEKKEGKGEI EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK
D	IKGEIEGKEEKKEGKGEI EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK
E	IKGEIEGKEEKKEGKGEI EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK
F	IKGEIEGKEEKKEGKGEIEGKEE -----KKEVENG PRK
G	IKGEIEGKEEKKEGKGEI EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK
H	IKGEIEGKEEKKEGKGEI EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK
I	IKGEIEGKEEKKEGKGE <b>K</b> EGKEEKKEGKGEIEGKEEKKEVENG PRK

**Figure 20**

A : Schéma du fragment *Nco2.5* porté par les génomes mitochondriaux de radis Ogura et les cybrides mâle stériles de *Brassica* (Bonhomme et al. 1991).

*trnfM* : gène codant pour un ARN de transfert formylméthionine

B : Alignement de séquences entre la séquence protéique identifiée par Bonhomme et al. (1992) et les différents variants de l'ORF138 (notés de C à I) décrits par Yamagishi et al. (2001) dans des génotypes de *Raphanus*. Le variant F correspond à l'ORF125. Le variant B n'a pas été représenté car il contient un changement de base silencieux.

# OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux menés au laboratoire depuis plusieurs années ont permis de mettre en évidence le gène mitochondrial responsable de la stérilité mâle cytoplasmique Ogura : l'*orf138*. Ce gène est exprimé de façon constitutive et la protéine correspondante a pu être observée dans tous les tissus de la plante. Le phénotype induit n'est cependant observé que dans les anthères. Au début de ce travail, il n'existait que très peu, voire aucune donnée sur l'importance des résidus de la protéine sur ses propriétés structurales, sur sa localisation submitochondriale et les éventuelles interactions où elle pouvait être impliquée au sein de la mitochondrie. C'est ainsi qu'aucun mécanisme permettant d'expliquer le mode d'action de la protéine ainsi que la spécificité tissulaire du phénotype induit n'avait été proposé.

Les objectifs de cette thèse étaient donc de développer des outils moléculaires et biochimiques afin d'obtenir des informations pertinentes sur cette protéine, permettant ainsi l'élaboration d'hypothèses solides quant au mécanisme de stérilité mâle. Nous avons donc choisi d'étudier la protéine ORF138 à plusieurs échelles :

- séquence primaire (**chapitre 1**)
- localisation intracellulaire dans différents systèmes (**chapitre 2**)
- associations moléculaires (**chapitre 3**)

Nous avons également tenté d'identifier des mécanismes physiologiques potentiellement induits par sa présence dans les mitochondries (**chapitre 4**).

# RESULTATS

Le but de l'étude menée pendant ce travail de thèse était de comprendre les relations entre la structure de la protéine ORF138 et sa fonction. C'est-à-dire rassembler les données qui permettront d'établir une relation entre les propriétés biochimiques et structurales de la protéine et son effet physiologique sur l'assise tapétale des anthères donc sur la production des grains de pollen. Du fait de son expression ubiquitaire, l'étude des propriétés biochimiques de la protéine ORF138 peut s'effectuer à partir de nombreux tissus végétaux ; néanmoins son seul effet physiologique observé à ce jour se localise dans une assise cellulaire peu accessible et peu abondante. Ainsi les travaux biochimiques menés à partir de ce tissu particulier sont techniquement difficiles. De plus la manipulation de la protéine chez le colza (génération de formes mutantes par exemple) n'est pas envisageable car, à ce jour, la transformation génétique mitochondriale n'est pas une technique disponible chez les plantes. Afin de contourner ce problème, l'établissement d'outils nous permettant de tester facilement et rapidement de nombreuses hypothèses est indispensable. Pour ce faire, des stratégies alternatives telles que l'expression en système hétérologue peuvent être également engagées. Nous avons donc choisi d'étudier la protéine ORF138 à plusieurs échelles : séquence primaire, structures secondaires et tertiaires, localisations intracellulaires, associations moléculaires et d'essayer d'identifier les mécanismes physiologiques potentiellement induits par son expression. L'ORF138 a été exprimée chez la bactérie *E. coli* et chez la levure *S. cerevisiae* mais aussi chez *A. thaliana*. L'effet de la présence de la protéine dans ces organismes (et dans leurs mitochondries pour les eucaryotes) a été analysé. Les travaux menés au cours de cette thèse englobent donc des approches biochimiques ainsi que des stratégies d'expression hétérologue.

Les approches utilisées sont indépendantes et ont été menées en parallèle. Les résultats obtenus dans chacune d'elles ont parfois été utiles pour des confirmations réciproques. J'ai donc choisi, au moment de faire le bilan de ce travail, de ne pas présenter les résultats dans l'ordre chronologique de leur obtention mais plutôt selon un déroulement logique afin d'en tirer les conclusions les plus pertinentes possibles en fonction de la question scientifique posée.

# **CHAPITRE I**

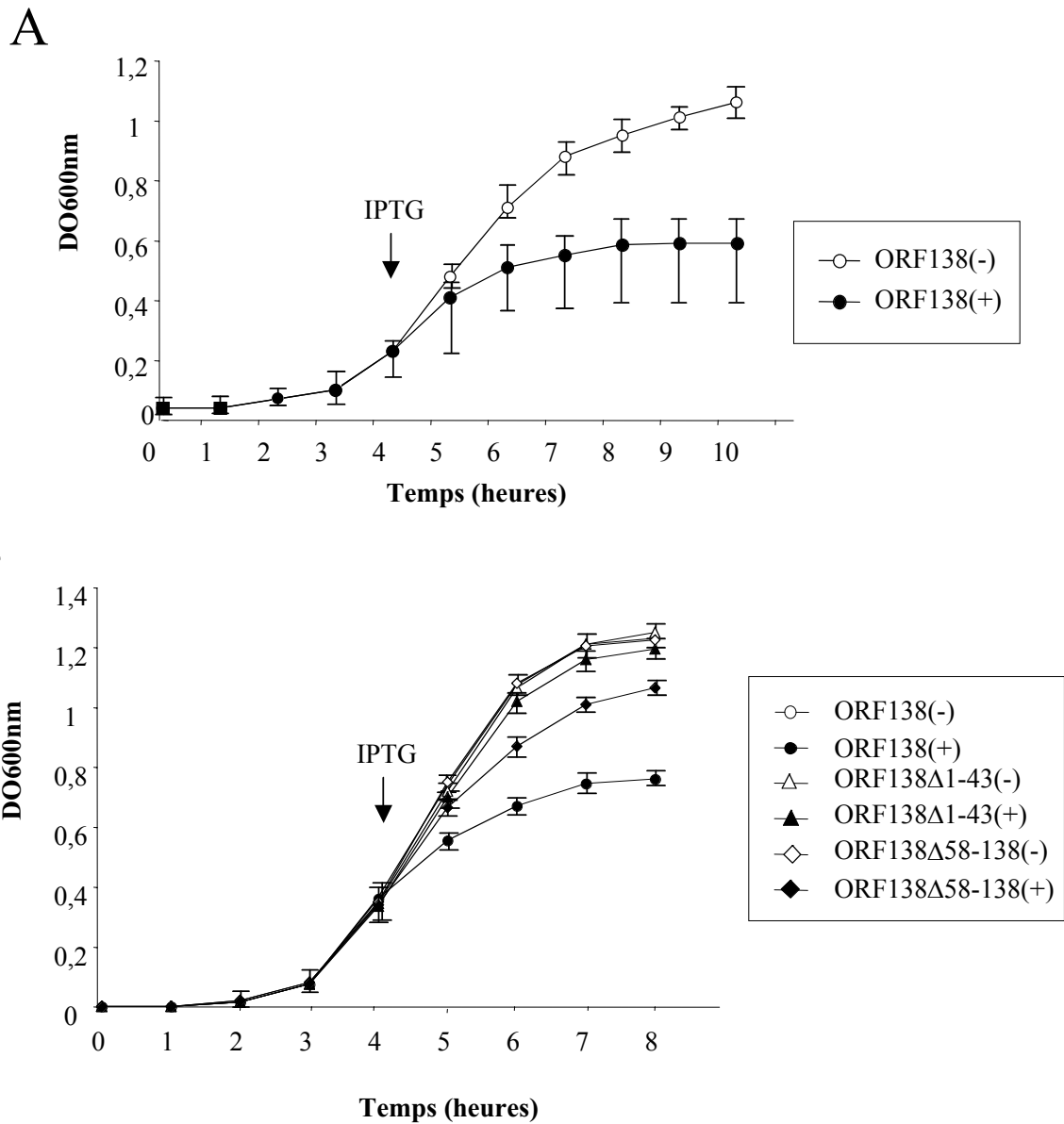
## **ANALYSE DE LA SEQUENCE PRIMAIRE DE L'ORF138**

## **1/ Introduction**

Une des nombreuses façons de comprendre l'action d'une protéine est d'établir les relations qui existent entre sa structure et sa fonction. Il s'agit donc d'identifier les domaines de la séquence primaire qui sont essentiels. Pour ce faire des modifications ciblées (basées sur des prédictions liées à l'étude de la séquence primaire de la protéine) ou bien aléatoires sont effectuées. Ensuite des comparaisons entre la forme sauvage de la protéine et les variants créés sont réalisées. Ainsi de nouvelles hypothèses peuvent voir le jour sur la base de résultats acquis par cette stratégie. Dans le cas qui nous concerne, la protéine ORF138 est une protéine codée par un gène mitochondrial. La transformation génétique des mitochondries de plante n'est pas possible, les mutations induites de la protéine ne peuvent donc pas être testées directement *in planta*. Nous devons donc utiliser un système hétérologue qui soit facile et rapide à utiliser et qui présente un phénotype à mesurer pour que les comparaisons soient facilitées. Des travaux de ce type ont permis à Rhoads et son équipe (Rhoads et al. 1995) d'étudier chez *E. coli* la biochimie ainsi que les relations aux membranes de la protéine mitochondriale T-URF13 responsable de la CMS Texas chez le maïs.

Afin de déterminer les relations entre la structure et la fonction de la protéine ORF138, un travail d'expression hétérologue de l'ORF138 chez la bactérie *E. coli* avait été initié avant mon arrivée au laboratoire (travaux de C. Gaillard). L'expression de la protéine ORF138 provoque une inhibition de la croissance de la bactérie comme le montre la figure 21. Cette inhibition ne requiert pas cependant une forte expression de la protéine (annexe 7). Cette inhibition n'est donc pas due à un détournement du métabolisme bactérien par le système d'expression hétérologue mais probablement à une action spécifique de la protéine. Bien qu'aucun élément ne nous permette d'établir une relation entre l'effet de l'ORF138 sur la croissance de *E. coli* et sa fonction dans la stérilité mâle, les deux phénomènes sont vraisemblablement liés aux caractéristiques structurales de la protéine que le système hétérologue nous permet d'explorer. Ce phénotype nous permet donc d'utiliser ce système pour mesurer l'effet de différentes mutations de l'ORF138.





**Figure 21**

A : Courbes de croissance d'*E. coli* exprimant l'ORF138

B : Courbes de croissance d'*E. coli* exprimant des formes tronquées de l'ORF138

La souche BL21(DE3)pLysS portant les différents plasmides a été utilisée comme décrit dans les Matériels et Méthodes.

ORF138 : souche portant le plasmide B1 (voir annexe 5) permettant l'expression de l'ORF138

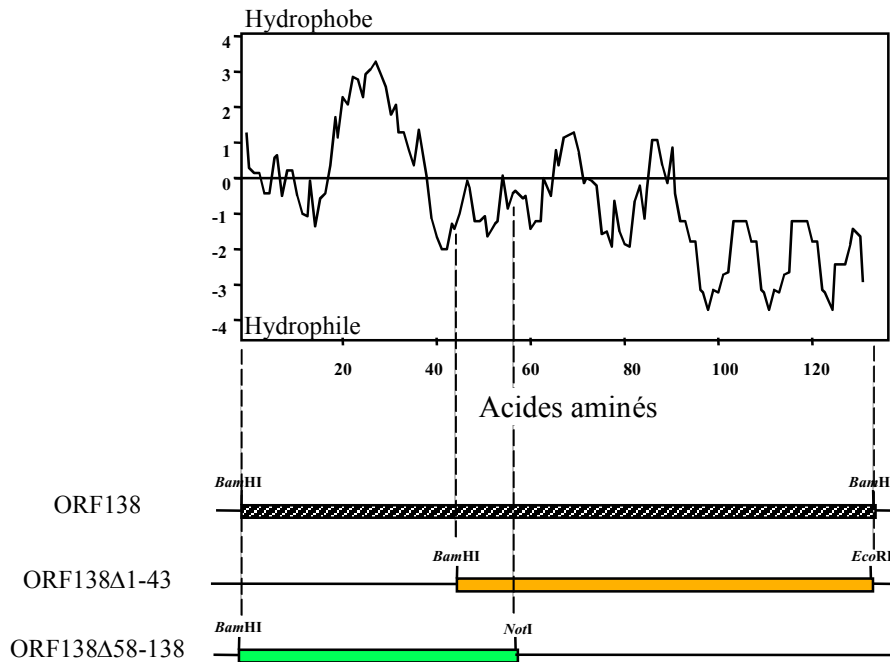
ORF138Δ1-43 : souche portant un plasmide permettant l'expression d'une protéine contenant les résidus 44 à 138 de l'ORF138 (voir annexe 7)

ORF138Δ58-138 : souche portant un plasmide permettant l'expression d'une protéine contenant les résidus 1 à 57 de l'ORF138 (voir annexe 7)

(-) sans IPTG, (+) avec 0,5 mM IPTG.

Lorsque nous observons la séquence primaire de la protéine, nous constatons que deux domaines distincts peuvent être considérés (figure 22). Le premier domaine, constitué des résidus 1 à 43, est majoritairement hydrophobe et contient la région transmembranaire prédite. Le deuxième domaine constitué des résidus 44 à 138 est majoritairement hydrophile et contient 3 répétitions du motif KGEIEGKEEKKE dans sa partie C-terminale. Dans un premier temps, deux formes tronquées ont été générées. La première (forme A) comprend les acides aminés 44 à 138 de l'ORF138 permettant la suppression du domaine transmembranaire prédit. La deuxième forme tronquée (forme B) exprimée chez la bactérie est une protéine contenant les acides aminés 1 à 57 de l'ORF138, région constituée essentiellement du domaine hydrophobe. La suppression de l'un ou l'autre de ces domaines conduit à un effet différent de celui induit par la protéine entière (figure 21). La forme A ne provoque plus ou très peu d'inhibition révélant ainsi l'importance du domaine hydrophobe dans le phénotype observé. La forme B présente un effet inhibiteur moins drastique que la protéine entière. Les niveaux d'expression de ces deux formes sont également très différents. La forme A est très largement produite comme la plupart des protéines hétérologues exprimées dans ces conditions alors que la forme B est probablement exprimée de façon peu abondante au même niveau que la protéine entière (voir détails dans l'annexe 7).

Ces résultats sont très encourageants pour tester différentes mutations de la protéine ORF138 chez *E. coli*. C'est pourquoi une double approche a été initiée. Nous avons introduit des mutations aléatoires sans *a priori* dans la séquence de l'ORF138 et nous avons également testé l'effet de mutations ciblées sur des résidus ou des domaines qui semblaient intéressants.



**Figure 22**

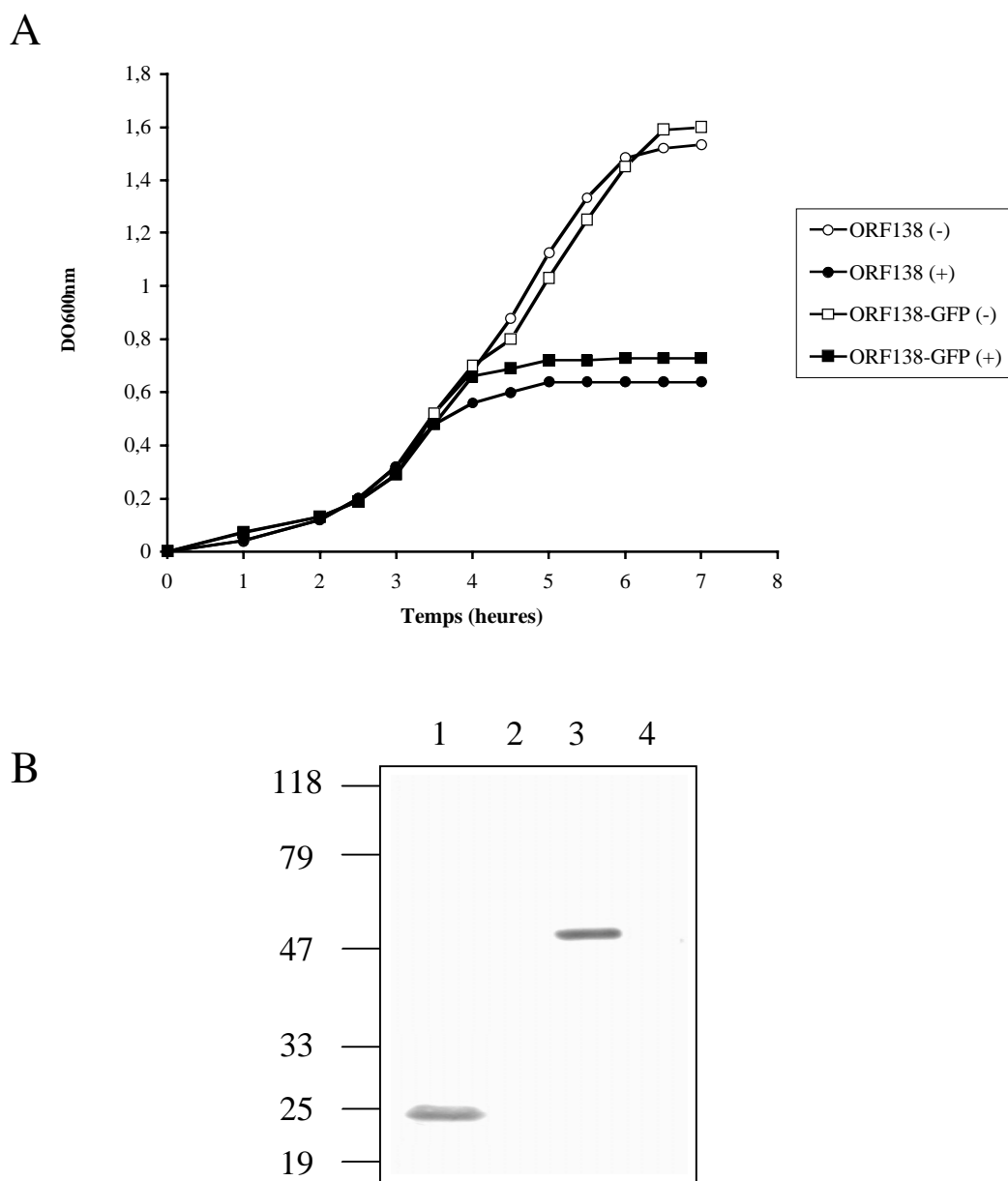
Représentation schématique des constructions de l'*orf138* pour l'expression hétérologue chez la bactérie. Les différentes parties de l'ORF138 sont indiquées en regard du profil d'hydrophobicité. La protéine ORF138Δ1-43 comporte la partie majoritairement hydrophile de l'ORF138 et la protéine ORF138Δ58-138 comporte la partie majoritairement hydrophobe de l'ORF138.

## **2/ Construction d'un système pour tester les mutations de l'ORF138 chez *E. coli***

Les résultats préliminaires présentés ci-dessus nous ont amenés à entreprendre la construction d'une collection de formes mutées de l'ORF138 afin d'identifier les acides aminés ou les domaines protéiques indispensables à l'effet de la protéine chez la bactérie.

Les mutations seront produites au hasard par le biais d'une PCR en conditions mutagènes. Après transformation d'*E. coli*, les clones chez lesquels l'expression de la protéine ne provoque plus d'effet délétère seront isolés. Puis, les mutations présentes dans les formes inefficaces de la protéine seront identifiées par séquençage. Cette méthode comporte néanmoins une limitation : les mutations engendrées par la PCR pourront aboutir à des changements de résidus ou à l'apparition de codons stop dans la phase ouverte de lecture de l'*orf138*. La surreprésentation des formes comportant des codons stop peut aboutir à une analyse peu informative. Afin de réduire significativement la proportion de ces formes dans les clones analysés, il a été décidé de produire une fusion traductionnelle entre l'ORF138 et la GFP. Le crible comportera donc une étape supplémentaire consistant à éliminer les clones ne présentant pas de signal GFP (clones n'exprimant pas une protéine ORF138 entière). Cependant l'utilisation de cette fusion dans notre crible est tributaire de deux paramètres : le premier est que l'expression de la protéine de fusion provoque un phénotype similaire à celui retrouvé lors de l'expression de la protéine ORF138 seule et le deuxième est que la protéine de fusion soit fonctionnelle et que son expression permette la détection d'un signal GFP.

La stratégie décrite dans l'annexe 1 a été utilisée pour générer une construction permettant l'expression d'une protéine de fusion ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur T7. Après introduction de ce vecteur dans la souche BL21(DE3)pLysS, les cinétiques de croissance réalisées ont montré que cette forme induit une inhibition similaire à celle provoquée par la protéine ORF138 seule (figure 23A). Cependant, les bactéries exprimant cette fusion ne présentent pas de fluorescence GFP bien que la protéine puisse être décelée à un niveau équivalent à l'ORF138 (figure 23B). Afin de vérifier la fonctionnalité dans *E. coli* du gène codant la GFP utilisée, nous avons entrepris la réalisation d'un nouveau vecteur (annexe 1). Il permet l'expression d'une protéine GFP sous le contrôle du promoteur T7. Ce plasmide a été construit de façon à être également utilisé comme vecteur de clonage des fragments issus de la PCR mutagène.



**Figure 23**

A : Courbes de croissance d'*E. coli* exprimant l'ORF138 et l'ORF138-GFP

La souche BL21(DE3)pLysS portant les plasmides B1 (voir annexe 5) permettant l'expression de l'ORF138 ou A2 (voir annexe 1) permettant l'expression de l'ORF138-GFP a été utilisée comme décrit dans les Matériels et Méthodes (-) sans IPTG, (+) avec 1 mM IPTG

B : Détection immunologique des protéines ORF138 et ORF138-GFP dans des extraits totaux d'*E. coli* à l'aide de l'anticorps anti-ORF138 purifié.

Piste 1 : extrait total d'*E. coli* induit portant le plasmide B1

Piste 2 : extrait total d'*E. coli* non induit portant le plasmide B1

Piste 3 : extrait total d'*E. coli* induit portant le plasmide A2

Piste 4 : extrait total d'*E. coli* non induit portant le plasmide A2

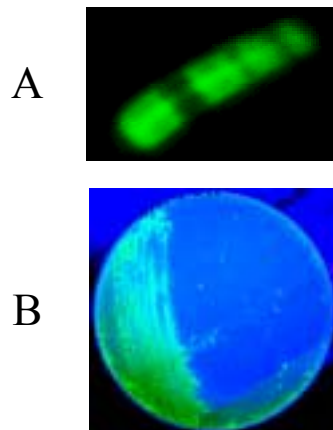
Extraits protéiques effectués à partir de 1/20 DO600nm

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

Après introduction de cette construction dans la souche BL21(DE3)pLysS, l'expression du gène codant la GFP a été induite et l'observation de fluorescence dans ces bactéries est possible sous microscope (figure 24A) mais aussi directement sur boîte de Pétri (figure 24B). Le gène codant pour la GFP utilisé permet donc l'expression d'une protéine fonctionnelle dans *E. coli*. L'absence de fluorescence lors de l'expression de la protéine de fusion ORF138-GFP peut éventuellement s'expliquer par une conformation particulière de l'ORF138 ne permettant pas le repliement adéquat de la GFP. Nous verrons ultérieurement quelles peuvent être les autres raisons de l'absence de fluorescence, néanmoins la stratégie a été maintenue pour la raison suivante : si les clones isolés lors du crible présentent une protéine de fusion permettant une fluorescence GFP, l'analyse de ces derniers nous donnera de précieuses informations sur les spécificités structurales de l'ORF138.

### **3/ Production et analyse des mutants aléatoires générés par PCR**

La stratégie mise en oeuvre pour générer la collection de mutations de l'*orf138* est présentée en figure 25 et en annexe 2. Afin de créer une population de formes mutées de l'*orf138*, une PCR en conditions mutagènes a été réalisée (cf. matériels et méthodes 2-1-2) puis l'utilisation d'enzymes spécifiques a permis le clonage de l'*orf138* en phase avec le gène codant la GFP. Plus de 500 clones ont été ainsi obtenus. La présence d'un insert a été testée par PCR sur 94 clones pris aléatoirement. Seulement 5 clones ne présentaient pas d'insert. De plus, la fréquence de mutation a été testée sur 10 clones indépendants pris au hasard. Les fréquences relatives d'insertion et délétion de base sont conformes à celles décrites par Cadwell et Joyce (Cadwell et al. 1994). En effet dans les conditions utilisées, nous observons que la proportion d'insertion / délétion de base est de 0,03% par base (similaire aux 0,05% décrit par les auteurs). Cependant le taux de substitution s'avère être plus élevé dans les conditions que nous avons utilisées puisque nous détectons un taux de 2,74% (contre 0,66% décrit par les auteurs). Cette différence peut résulter des compositions différentes des tampons employés, de la fidélité de la *Taq* polymérase utilisée et probablement de la séquence nucléotidique du gène cible. La totalité des colonies obtenues a alors été récoltée directement sur boîte à l'aide de 3 mL de milieu LB. Les plasmides correspondants ont alors été extraits en mélange et utilisés pour transformer les bactéries BL21(DE3)pLysS afin de réaliser le crible.

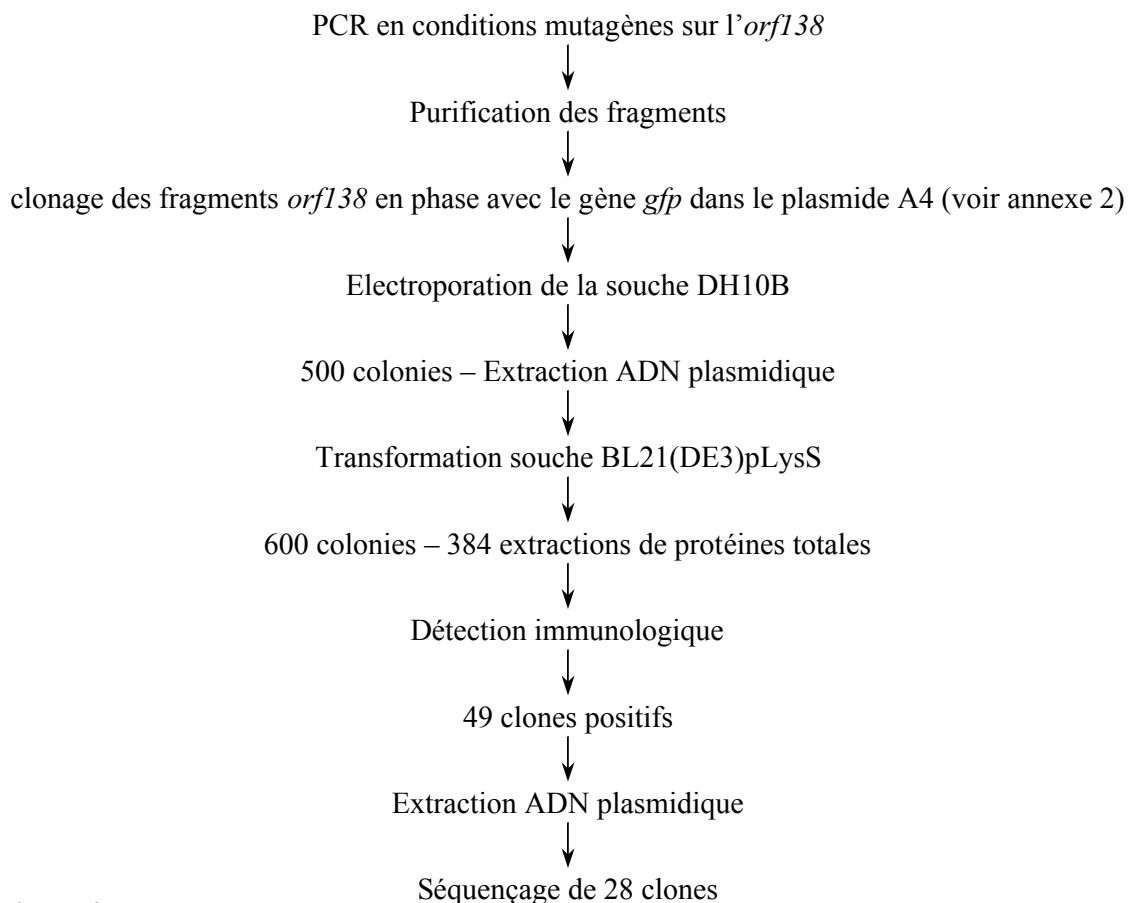


**Figure 24**

Photos de bactéries portant le plasmide A4 (voir annexe 1) permettant l'expression de la GFP

A : Bactérie observée au microscope confocal

B : Souche BL21(DE3)pLysS portant le plasmide A4 observée sur boîte de Pétri contenant de l'IPTG



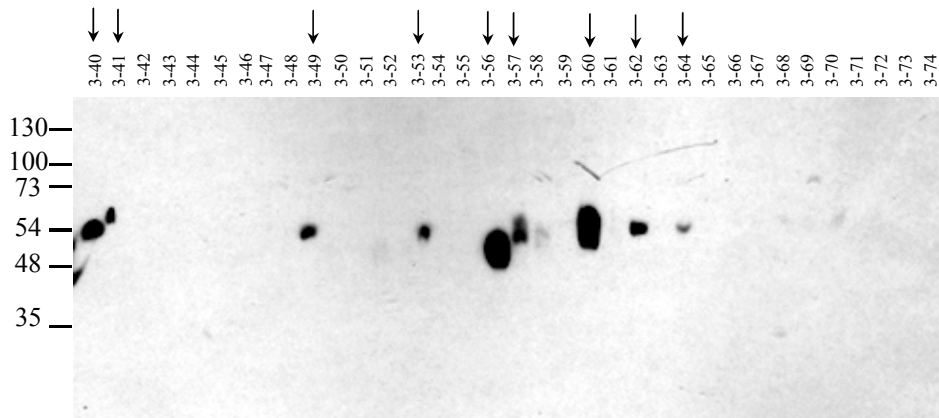
**Figure 25**

Stratégie mise en œuvre pour générer et cribler la collection de mutation de l'*orf138* chez *E. coli*

Le produit de transformation des bactéries BL21(*DE3*)pLysS a été alors étalé sur un milieu sélectif supplémenté en IPTG à une concentration finale de 1 mM. Après 16 heures d'incubation à 37°C, environ 600 colonies "résistantes" ont été isolées. La présence d'un insert a été testée par PCR sur 28 clones pris aléatoirement. Il s'avère que seulement 2 clones ne contenaient pas d'insert. Sur les 600 colonies obtenues, aucune d'entre elles ne présentaient de fluorescence GFP lors d'un éclairage sous une plaque UV. 384 clones ont été alors ensemencés en milieu liquide et une induction de l'expression de chaque gène a été réalisée pendant 4 heures. Les protéines totales de chaque clone sont alors extraites, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide et enfin transférées sur membrane de nitrocellulose. La détection de protéines par l'anticorps anti-ORF138 a été positive pour 48 clones. Ces clones expriment donc une protéine reconnue par le sérum (figure 26) mais ne conduisant pas à une inhibition de croissance.

L'ADN de ces clones a alors été extrait et 28 d'entre eux ont été séquencés. L'alignement des séquences protéiques (figure 27) nous permet de constater que les mutations sont bien réparties aléatoirement le long de la séquence, validant ainsi la méthode. De plus tous les clones isolés et séquencés présentent des codons stop précoces dans la phase ouverte de lecture (allant des résidus 3 à 42 de l'ORF138) ; les tailles des signaux observés par détection immunologique (figure 26) ne peuvent être expliquées que par une reprise de la traduction de ces gènes au niveau des codons méthionines en positions 35 ou 53, ou au niveau de codons méthionines générés par la mutagenèse. Ces résultats nous montrent que l'unique changement de quelques acides aminés ne suffit pas à abolir l'inhibition de la croissance provoquée par l'expression de protéines "ORF138-like". Ces résultats nous montrent également que seule la dissociation des domaines hydrophobes (contenant le domaine transmembranaire prédit) et hydrophiles permet l'altération de l'inhibition de la croissance chez *E. coli*. Enfin, l'expression simultanée des deux domaines de la protéine dans certains clones (par exemple les clones 2-29 et 3-53) n'affecte donc pas la croissance de la bactérie en milieu solide. Ceci implique potentiellement une interaction entre les domaines hydrophobes et hydrophiles qui nécessite que ces domaines soient portés par la même molécule.





**Figure 26**

Exemple de résultat obtenu après détection immunologique des protéines ORF138 dans des extraits totaux de bactéries issues du criblé de la collection de mutations de l'ORF138. Les pistes sont numérotées à l'aide des numéros des clones "résistants" à l'IPTG et les clones présentant un signal sont marqués d'une flèche. Extraits protéiques effectués à partir de 1/20 DO600nm. Les chiffres à gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa.



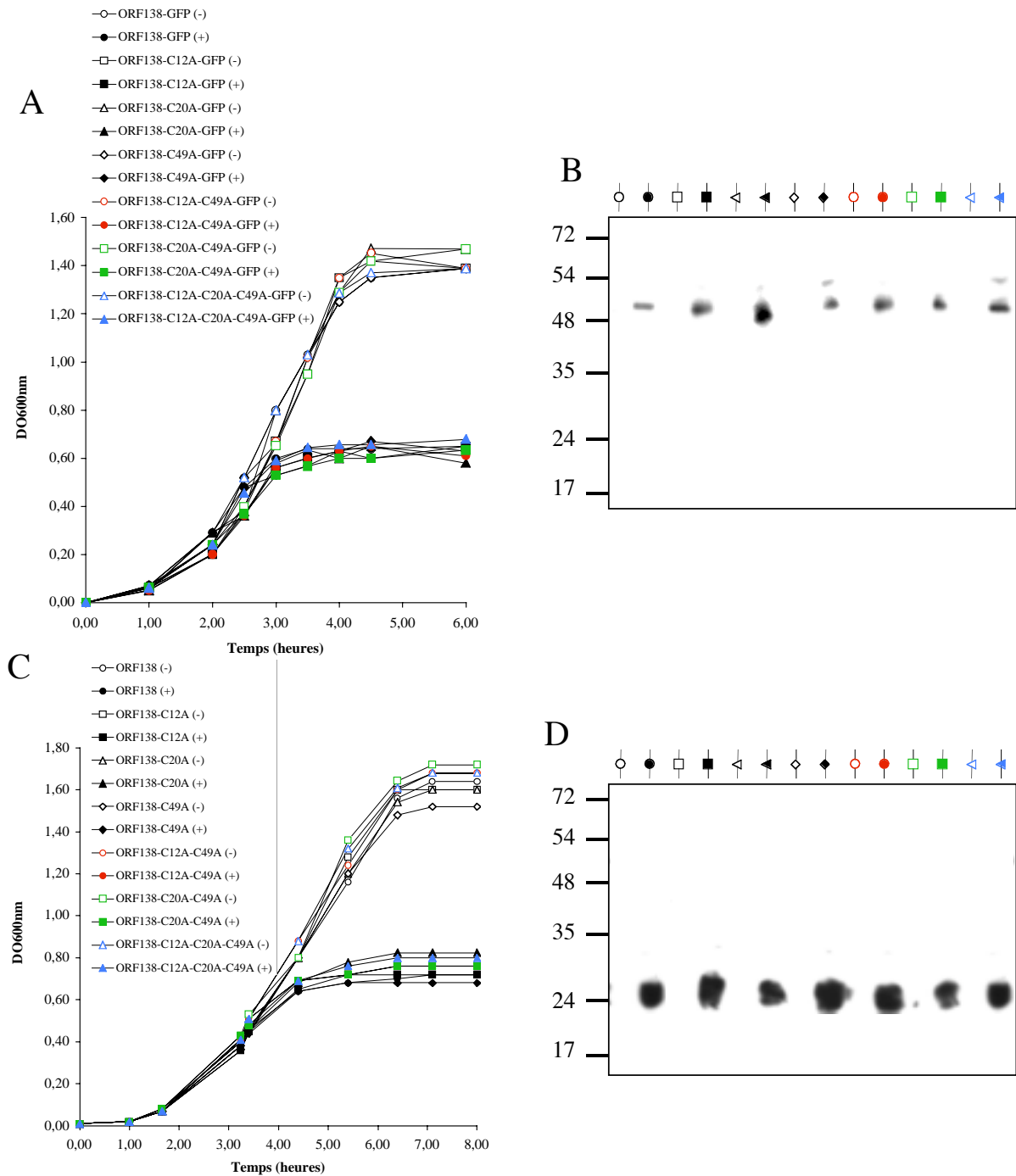
**Figure 27**

Alignement de séquences protéiques des différents clones issus du criblage de la collection de mutations de l'ORF138. Les numéros des clones présentés à la figure 26 sont encadrés. Les résidus 1 à 35 sont codés par le vecteur pET29a(+). Les couleurs sont assignées par le logiciel d'alignement (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>) : en rouge les résidus les plus conservés, en noir les moins conservés.

### **3/ Mutations ponctuelles dirigées sur les codons Cys**

La protéine ORF138 contient 3 cystéines aux positions 12, 20 et 49. Les cystéines sont des résidus comportant dans leur chaîne latérale un groupement thiol. Ce dernier peut être réduit ou oxydé. Si le groupement est oxydé, il permet la génération d'une liaison covalente entre lui-même et un autre groupement thiol situé sur un autre résidu cystéine (formant ce qu'on appelle un pont disulfure). Les ponts disulfures potentiellement formés entre ces résidus peuvent jouer un rôle primordial dans la structure tertiaire des protéines (repliement ou liaisons entre différentes sous-unités d'un complexe protéique) et donc indirectement dans l'action des protéines. En effet, l'établissement de liaisons inter ou intrachaîne peut conditionner les propriétés structurelles des protéines et donc également conditionner leurs propriétés fonctionnelles. Dans notre cas, les résidus cystéines de l'ORF138 ont été remplacés par des résidus alanine qui sont dépourvus de groupement thiol rendant ainsi impossible l'établissement de ponts disulfures.

Les formes mutées ont été désignées par l'abréviation CxA indiquant le remplacement d'un résidu cystéine par un résidu alanine à la position x. Les formes C12A, C20A, C49A, C12A-C49A, C20A-C49A et C12A-C20A-C49A ont donc été générées. Les constructions correspondantes permettant l'expression de ces 6 formes de l'ORF138 (en fusion avec la GFP ou seules) sous le contrôle du promoteur T7 sont décrites en annexes 3 et 4. Tous les clones ainsi générés (possédant les formes mutées de l'ORF138 avec ou sans fusion traductionnelle avec la GFP) ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance d'*E. coli*. Les figures 28A et 28 C montrent les courbes de croissance de bactéries exprimant ces protéines d'intérêt. L'expression des protéines ORF138 où les codons cystéines ont été substitués ne provoque pas une inhibition de la croissance différente de celle provoquée par la protéine sauvage (figures 28A et 28C). Leur niveau d'expression a également été vérifié par immunodétection (figure 28B et 28D). Comme attendu, le niveau d'expression des différentes protéines mutantes ne diffère pas de celui de l'ORF138. Dans les conditions testées, le changement des résidus cystéines en résidus alanine ne conduit donc pas à l'altération de l'effet inhibiteur de la protéine ORF138 sur la croissance d'*E. coli*.



**Figure 28**

A et C : Courbes de croissance d'*E. coli* exprimant les différentes protéines ORF138 où les cystéines ont été substituées en fusion (A) ou non (C) avec la GFP. (-) sans IPTG, (+) avec 1 mM IPTG.

B et D : Détection immunologique des protéines ORF138 où les cystéines ont été substituées en fusion (B) ou non (D) avec la GFP. Les symboles utilisés pour les courbes de croissance sont ici répétés en face de la piste correspondante

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

#### **4/ Mutations par délétions d'un domaine interne**

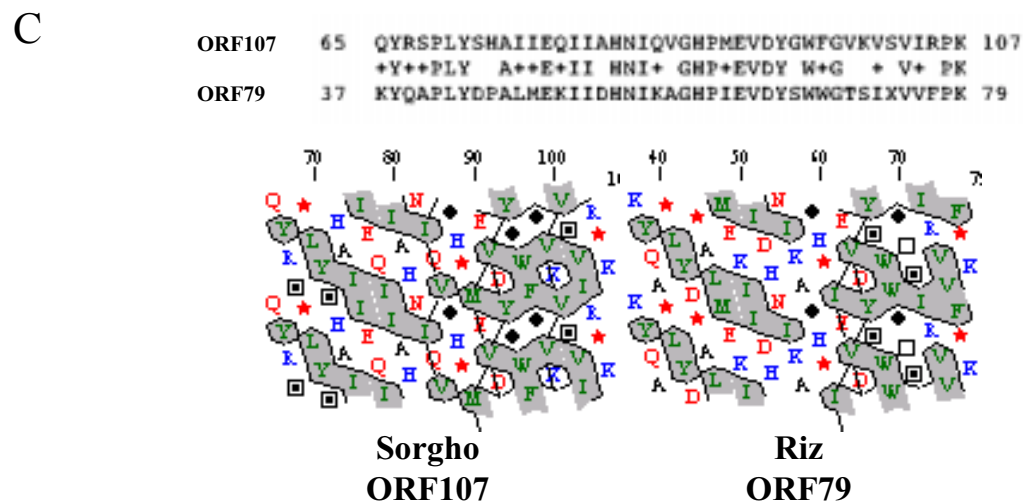
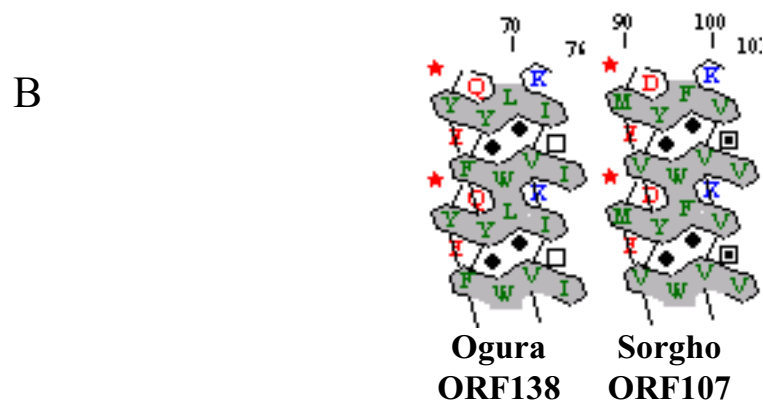
Les résultats de la mutagenèse aléatoire nous suggèrent que les relations entre la structure et la fonction de l'ORF138 s'articulent autour d'interactions de domaines protéiques définis plutôt qu'autour d'acides aminés clés. Néanmoins, lors d'une recherche de type BlastP avec la séquence de l'ORF138 contre une base de données non redondante de séquences protéiques, aucun alignement significatif n'est obtenu avec d'autres séquences que celle de l'ORF138 (ou de l'ORF125). Par contre, si la stringence de l'alignement est diminuée (valeur de l'"expect" à 100 au lieu de 10), un certain nombre d'alignements peuvent être obtenus. Comme attendu, les scores de ces alignements sont très faibles et semblent peu significatifs. Un alignement a cependant attiré notre attention car il implique l'ORF107 de Sorgho. L'ORF107 a été identifiée par Tang et ses collaborateurs (Tang et al. 1996) et a été impliquée dans une SMC chez le Sorgho. Cet alignement porte sur les résidus 62 à 76 de l'ORF138 et les résidus 89 à 103 de l'ORF107 (figure 29A). Afin de déterminer si cet alignement révèle des caractéristiques structurales communes aux deux protéines, nous avons comparé les profils HCA (Callebaut et al. 1997, <http://smi.snv.jussieu.fr/hca/hca-seq.html>) des régions alignées à l'aide du logiciel Octopus (<http://membres.lycos.fr/pdurand/octopus.html>). Le logiciel DrawHCA utilise les propriétés physico-chimiques des acides aminés, tels que la charge et le caractère hydrophobe/hydrophile, pour former des profils permettant de comparer des protéines pouvant adopter des structures identiques à partir de séquences primaires différentes. Le logiciel Octopus permet d'aligner des profils HCA à partir d'alignements de séquences. L'utilisation du logiciel Octopus nous permet d'observer la très grande similitude qui existe entre les protéines ORF138 et ORF107 sur ce domaine de 15 acides aminés (figure 29B). De plus, la protéine ORF107 présente des similitudes avec la protéine ORF79 impliquée dans une SMC de riz (Akagi et al. 1994; Tang et al. 1996). L'alignement par Octopus de leurs profils HCA est présenté figure 29C. Il est intéressant de noter que le domaine permettant l'alignement entre l'ORF138 et l'ORF107 est inclus dans une région commune à l'ORF107 et à l'ORF79, plus large.

**A** >gi|7489656|pir|T14646 hypothetical protein 107 - Sorghum mitochondrion  
 gi|1620545|gb|AAC49458.1| hypothetical ORF107  
 Length = 107

Score = 26.9 bits (58), Expect = 15  
 Identities = 8/15 (53%), Positives = 11/15 (73%)

ORF138 Query: 62 PYEFQYGNLGVKITI 76  
 P E YGW GVK+++

ORF107 Sbjct: 89 PMEVDYGNFGVKVSV 103



**Figure 29**

A : Résultat du blast effectué à l'aide de la séquence protéique de l'ORF138 et identifiant une région de l'ORF107.

B : Profils HCA correspondant aux séquences de l'ORF138 et de l'ORF107 alignées lors du blast.

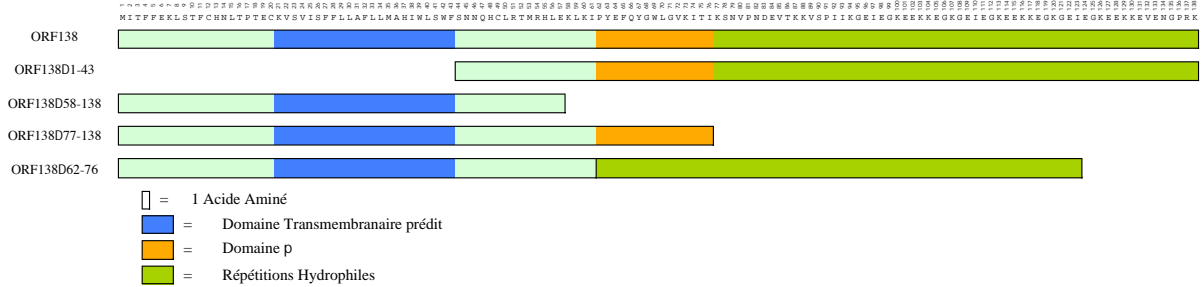
C : Alignement local des régions similaires des protéines ORF107 et ORF79 et profils HCA correspondants de ces régions.

L'existence de caractéristiques structurales communes entre ces 3 protéines est particulièrement remarquable compte tenu de l'absence d'observation de ce type entre protéines de SMC non apparentées. C'est pourquoi j'ai entrepris de tester le rôle de ce domaine dans l'effet de l'ORF138 sur la croissance d'*E. coli*. Deux nouvelles formes de l'ORF138 ont été produites. La première comprend les résidus 1 à 76 et contient le domaine hydrophobe dont une partie est prédite comme transmembranaire et le domaine commun (nommé  $\pi$ ) décrit ci-dessus. Elle sera nommée ORF138 $\Delta$ 77-138 (figure 30A). La deuxième contient les résidus 1 à 61 puis 77 à 138 et correspond donc à la suppression du domaine  $\pi$  caractérisé. Elle sera nommée ORF138 $\Delta$ 62-76 (figure 30A). La construction des vecteurs permettant l'expression de ces 2 formes de l'ORF138 sous le contrôle du promoteur T7 est décrite en annexe 5.

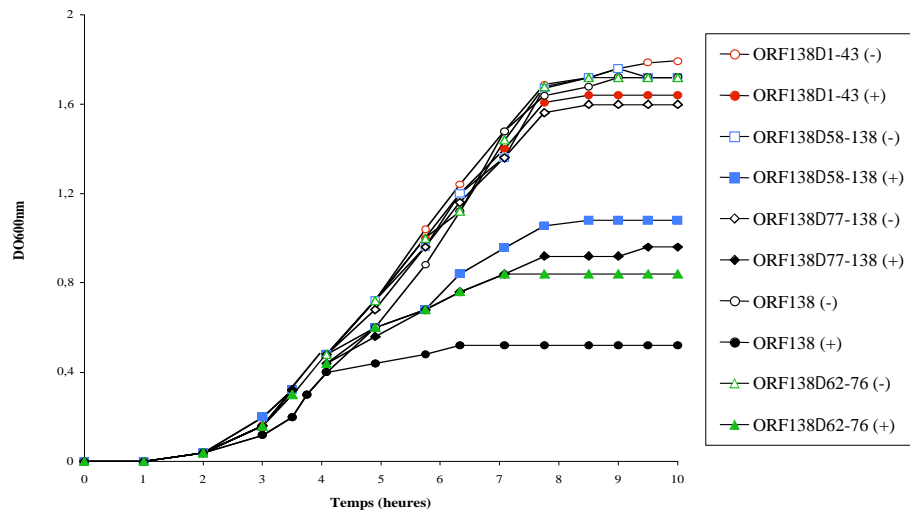
Après transfert des vecteurs dans la souche BL21(DE3)pLysS, l'effet de ces deux nouvelles formes tronquées sur la croissance de la bactérie a été testé comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes (figure 30B). Cet effet a été testé en parallèle avec les autres formes tronquées précédemment produites. Si nous comparons les conséquences de l'expression des différentes formes sur la croissance de la bactérie, l'effet inhibiteur de la protéine ORF138 $\Delta$ 77-138 semble être plus marqué que celui provoqué par la protéine ORF138 $\Delta$ 58-138 (forme B). L'expression de la protéine ORF138 $\Delta$ 62-76 semble provoquer une inhibition moins forte que la protéine entière mais plus marquée que toutes les autres protéines. La protéine ORF138 semble comporter des propriétés structurales qu'elle ne peut acquérir qu'à l'aide de trois domaines distincts : le domaine hydrophobe (résidus 1 à 43), le domaine commun à 3 protéines de SMC (résidus 62 à 76) et le domaine hydrophile contenant 3 répétitions du motif KGEIEGKEEKKE (résidus 77 à 138).

Le niveau d'expression des protéines a également été étudié (figure 30C). Les protéines ORF138 $\Delta$ 58-138 (forme B) et ORF138 $\Delta$ 77-138 n'ont pu être détectées car elles ne comportent pas d'épitopes reconnus par l'anticorps (anticorps qui a été obtenu contre la forme B). Les tentatives de détection de la forme ORF138 $\Delta$ 62-76 n'ont pas donné lieu à l'identification de signal. Il semble donc que la protéine ORF138 $\Delta$ 62-76 présente, en conditions dénaturantes, une conformation qui empêche sa détection par l'anticorps dirigé contre l'ORF138. Cette altération peut suggérer un rôle structurant des 15 résidus absents. Il est cependant nécessaire de le vérifier, par exemple, en réalisant une synthèse *in vitro* suivie par une tentative de détection immunologique de la protéine.

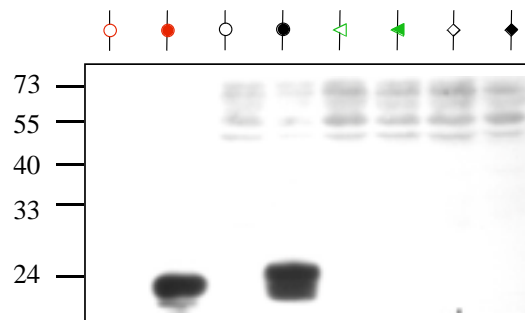
A



B



C



**Figure 30**

A : Représentation schématique des différentes tronquatures de l'ORF138.

B : Courbe de croissance d'*E. coli* exprimant les différentes protéines ORF138. (-) sans IPTG, (+) avec 1 mM d'IPTG.

C : Détection immunologique des protéines ORF138 tronquées. Les symboles utilisés pour les courbes de croissance sont ici répétés en face de la piste correspondante. Les extraits protéiques sont effectués à partir de 1/20 DO600nm à l'exception des extraits de l'ORF138D1-43 qui sont effectués à partir de 1/400 DO600nm.

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa.

Les études menées sur la séquence primaire de l'ORF138 nous ont permis d'affiner l'analyse de sa structure et d'obtenir des résultats prometteurs. En effet, l'association des domaines hydrophobe et hydrophile de la protéine dans la même molécule est indispensable à son effet chez la bactérie et un domaine de 15 acides aminés dont la structure secondaire est conservée entre 3 protéines de SMC non apparentées a été mis en évidence et semble également jouer un rôle dans cet effet. De plus, il semblerait que l'absence de ce domaine entraîne de telles modifications de la structure du domaine hydrophile que celui-ci n'est plus reconnu par l'anticorps.

Une analyse de la structure primaire, si elle est indispensable, n'est toutefois pas suffisante. Pour comprendre l'action d'une protéine comme l'ORF138, il faut savoir comment elle s'intègre dans les structures cellulaires où elle agit.



## **CHAPITRE II**

# **LOCALISATION CELLULAIRE ET SUBMITOCHONDRIALE DE L'ORF138**

Une autre partie du travail a eu comme objectif d'établir la localisation intracellulaire voire submitochondriale de la protéine dans les différents systèmes disponibles (mitochondries de colza, mitochondries de levure *S. cerevisiae* et bactérie *E. coli*). En effet, une localisation fine de la protéine ORF138 dans ces systèmes nous permettra de réduire le champ de nos recherches à des compartiments cellulaires parfois bien caractérisés (membrane interne mitochondriale par exemple). Cela nous permettra éventuellement d'établir des relations entre les différents systèmes étudiés pour choisir quel modèle semble être le plus adapté pour tester de nouvelles hypothèses qui seraient plus difficiles à tester directement sur les mitochondries de colza.

Ces travaux, complémentaires aux études sur la séquence primaire proprement dite, nous permettront de confronter les résultats des deux approches afin d'affiner les hypothèses de travail et éventuellement de proposer un modèle. Ce chapitre décrit donc la localisation membranaire de l'ORF138 dans les différents systèmes étudiés.

## **1/ Localisation submitochondriale de l'ORF138 chez le colza**

Les travaux antérieurs de caractérisation de l'ORF138 dans les mitochondries de colza (Grelon et al. 1994) ont permis de montrer que la protéine ORF138 est une protéine intrinsèque aux membranes mitochondriales. Cette donnée peut être associée à l'existence d'un domaine hydrophobe dont une partie est prédite comme transmembranaire. Nous avons également prouvé le caractère déterminant de ce domaine dans l'effet de la protéine sur la croissance de la bactérie. La localisation submitochondriale de l'ORF138 (membrane interne ou membrane externe) nous permettra de dégager des hypothèses de travail très différentes et adaptées à l'existence potentielle de protéines partenaires, leur identité restant alors à déterminer.

Le fractionnement de membranes mitochondriales est effectué comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes à partir de mitochondries de plantules étiolées. La proportion de membrane externe dans la composition totale d'une mitochondrie oscille entre 0,1 et 1 % (Michel Neuberger, communication personnelle), c'est pourquoi le fractionnement des membranes mitochondriales nécessite de manipuler des quantités importantes de matériel. C'est donc à partir de l'équivalent d'environ 10 mg de protéines mitochondriales que cette expérience est menée. Après de nombreux essais infructueux pour l'optimisation de nombreux paramètres liés aux propriétés des mitochondries de colza utilisées mais aussi liés à la proportion de mitochondries intactes dans nos préparations, les conditions optimales ont été déterminées et le fractionnement ainsi réalisé. Ce fractionnement permet donc l'isolement de deux fractions nommées IM (mitoplastes + membranes externes) et OM (membranes externes).

Les différentes fractions (IM et OM) sont examinées afin de déterminer la part de membrane externe présente dans l'échantillon par l'observation en spectrométrie de la réduction du cytochrome c par une activité NADH cytochrome c oxydoréductase. Cette activité est due à l'action de deux complexes moléculaires : le complexe III de la chaîne respiratoire (sensible à un inhibiteur : l'antimycine A) qui est située dans la membrane interne mitochondriale et une enzyme située sur la membrane externe et qui est insensible à l'antimycine A. En mesurant la réduction du cytochrome c avant et après ajout d'antimycine A, on peut donc calculer la proportion de membranes externes dans les échantillons. Les résultats décrits dans le tableau 1 montrent que la méthode de séparation finalement utilisée permet l'isolement d'un échantillon IM présentant une proportion d'activité NADH cytochrome c oxydoréductase sensible à l'antimycine A plus importante que l'échantillon mitochondrial (63,3 % contre 41,7%) et d'un échantillon OM présentant une proportion d'activité NADH cytochrome c oxydoréductase insensible à l'antimycine A plus importante que l'échantillon mitochondrial (72,7 % contre 58,3%). Les échantillons IM et OM sont donc bien enrichis respectivement en membrane interne et externe.

La méthode de séparation étant validée la détection de l'ORF138 dans ces fractions a été réalisée. Nous pouvons observer sur la figure 31 la détection de l'ORF138 dans les échantillons. La quantité de protéine ORF138 est beaucoup plus importante dans l'échantillon IM que dans les échantillons mitochondriaux et OM. Ceci nous permet de conclure en une localisation de l'ORF138 dans la membrane interne des mitochondries de colza.

	activité spécifique NADH cytochrome c oxidoréductase		% d'activité insensible à l'antimycine A	% d'activité sensible à l'antimycine A
	sans antimycine A	avec antimycine A		
1	1,73	1	58,3	41,7
2	2,61	1,9	72,7	27,3
3	2,98	1,09	36,7	63,3

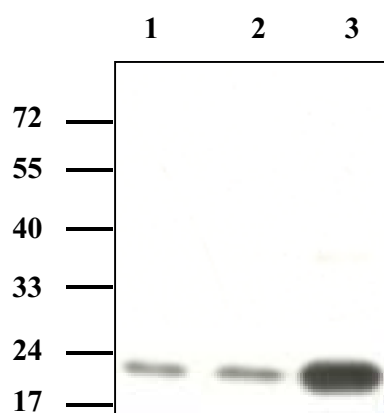
**Tableau 1**

Activités NADH cytochrome c oxydoréductase et proportion des activités insensible et sensible à l'antimycine A. Les activités spécifiques sont exprimées en pmol de cytochrome c réduit par seconde et par mg de protéines.

1 : échantillon mitochondrial avant fractionnement

2 : échantillon OM

3 : échantillon IM



**Figure 31**

Détection immunologique de l'ORF138 dans les échantillons issus du fractionnement mitochondrial chez le colza.

1 : échantillon mitochondrial avant fractionnement

2 : échantillon OM

3 : échantillon IM

Extraits protéiques contenant 5 µg de protéines

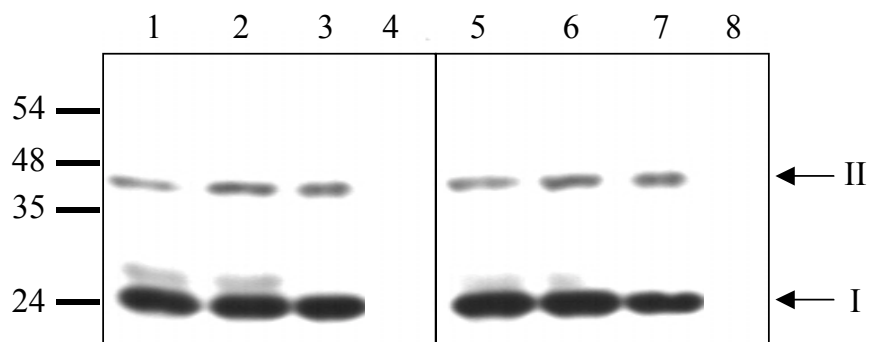
Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

## **2/ Topologie de l'ORF138 dans la membrane**

Nous avons déterminé la localisation submitochondriale de la protéine ORF138 chez le colza. Néanmoins connaître l'orientation de la protéine lorsqu'elle est insérée dans la membrane constituera un atout précieux pour émettre des hypothèses quant au rôle des domaines préalablement identifiés.

Afin de déterminer l'orientation de l'ORF138 dans la membrane interne des mitochondries de colza, des mitochondries ainsi que des mitoplastes ont été soumis à une attaque protéolytique. La protéinase K (endoprotéase clivant la liaison peptidique) a été utilisée dans notre cas. Les résidus exposés au milieu sont alors dégradés et la taille de la protéine est estimée par migration sur gel puis détection par western blot.

Nous avons mené cette protéolyse sur des mitochondries intactes et sur des mitoplastes. Un témoin positif a également été inclus par l'ajout de détergent (disparition totale de la protéine puisqu'elle est solubilisée par le détergent). La figure 32 nous montre donc le comportement de l'ORF138 par rapport à cette attaque protéolytique dans les différentes conditions utilisées. Nous pouvons observer qu'un signal correspondant à l'ORF138 peut être détecté pour les traitements de mitochondries intactes confirmant la localisation de l'ORF138 dans la membrane interne. L'immunodétection de l'ORF138 dans les échantillons issus d'attaques protéolytiques sur mitoplastes permet l'observation de profils identiques à ceux observés sur mitochondries. La protéine ORF138 est donc inaccessible à une digestion protéolytique effectuée sur des mitoplastes. Nous pouvons dès lors penser que l'ORF138 ne possédant qu'un segment transmembranaire prédit ne comporterait donc aucun résidu exposé à l'espace intermembranaire.



**Figure 32**

Détection immunologique de l'ORF138 après traitement d'extraits mitochondriaux ou de mitoplastes à la protéinase K.

Pistes 1, 2, 3 et 4 : extraits mitochondriaux

Pistes 5, 6, 7 et 8 : mitoplastes

Pistes 1 et 5 : échantillons non traités

Pistes 2 et 6 : échantillons traités au Triton X-100 à 0,1 % (v/v)

Pistes 3 et 7 : échantillons traités à la protéinase K à 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Pistes 4 et 8 : échantillons traités au Triton X-100 à 0,1 % (v/v) et à la protéinase K à 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Extraits protéiques contenant 10  $\mu\text{g}$  de protéines

I : monomère de l'ORF138

II : dimère de l'ORF138

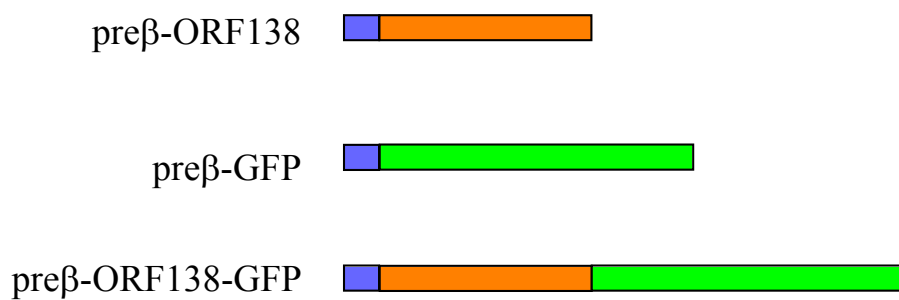
Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

### **3/ Localisation de l'ORF138 dans les mitochondries de levure**

Afin de développer un système eucaryote nous permettant de tester différents variants de l'ORF138 (impossibles à tester *in planta*), des travaux antécédents (cf annexe 7) ont permis d'exprimer l'ORF138 chez la levure *S. cerevisiae*. Pour étudier les caractéristiques de l'ORF138 dans les mitochondries de levure, il a été choisi de l'exprimer à partir du cytoplasme, fusionnée avec une préséquence à adressage mitochondrial. Le peptide signal de la sous unité  $\beta$  de l'ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia* (pre $\beta$ ) comportant les 59 premiers acides aminés ainsi que le site de clivage de cette protéine a été utilisé. Différents travaux (Chaumont et al. 1995 ; Logan et al. 2000 ; Duby et al. 2001) ont montré que cette séquence pouvait être utilisée avec succès pour un adressage mitochondrial chez la levure et les plantes. Il a également été choisi d'exprimer la protéine GFP ainsi que la protéine ORF138-GFP pour effectuer des observations cytologiques (cf. chapitre IV et annexe 7). Les différentes constructions utilisées chez la levure sont représentées figure 33. Elles permettent l'expression des protéines pre $\beta$ -ORF138, pre $\beta$ -GFP et pre $\beta$ -ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur Met25 qui est réprimé en présence de méthionine.

Nous nous sommes donc attachés à identifier la localisation cellulaire et submitochondriale des protéines pre $\beta$ -ORF138 et pre $\beta$ -ORF138-GFP. L'enrichissement de ces protéines dans des extraits protéiques mitochondriaux a été vérifié (résultats non montrés). Il est à noter que la détection des protéines pre $\beta$ -ORF138 et pre $\beta$ -ORF138-GFP en western blot est plus difficile que celle de l'ORF138 dans les mitochondries de colza. Ceci est probablement dû au faible niveau d'expression des deux protéines (la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP étant de surcroît moins abondante que la protéine pre $\beta$ -ORF138).

Nous avons également testé la capacité des protéines étudiées à s'associer aux membranes mitochondriales. En effet, une localisation membranaire nous fournirait une première validation du système utilisé. De plus les compartiments solubles de la mitochondrie (matrice et espace intermembranaire) pourront être ainsi omis dans les étapes de fractionnement.



**Figure 33**

Représentation schématique des différentes constructions utilisées chez la levure *S. cerevisiae* BY384.

Les séquences codantes sont représentées par des rectangles de couleur.

Bleu : préséquence de la sous unité  $\beta$  de l'ATPase de *N. plumbaginifolia*

Orange : gène codant l'ORF138

Vert : gène codant la GFP

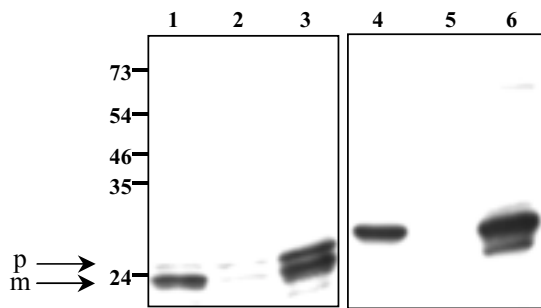
Les gènes sont sous le contrôle du promoteur Met25, réprimé en présence de méthionine.



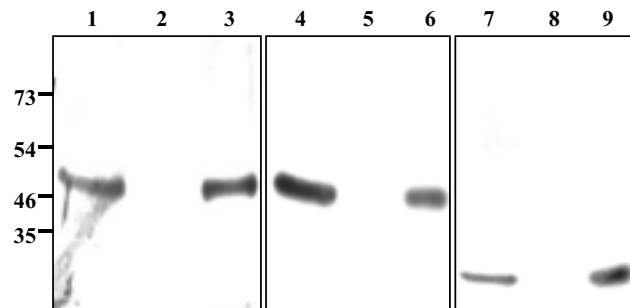
Afin de déterminer si les protéines exprimées dans ce système sont associées aux membranes, des traitements alcalins ont donc été effectués. En effet, Fujiki et collaborateurs (Fujiki et al. 1982) ont montré qu'un traitement des membranes à l'aide d'une solution de carbonate de sodium dans des conditions basiques suivi d'une centrifugation permettait la séparation de protéines membranaires périphériques (retrouvées dans le surnageant) et de protéines membranaires intrinsèques (retrouvées dans le culot). Les figures 34 et 35 montrent que les protéines ORF138 et ORF138-GFP sont détectées exclusivement dans les fractions insolubles à l'issue du traitement et sont donc intrinsèques aux membranes mitochondriales de levure.

Après de nombreux essais infructueux, nécessaires à l'optimisation des conditions expérimentales du fractionnement, les membranes mitochondriales de levures exprimant les protéines pre $\beta$ -ORF138 et pre $\beta$ -ORF138-GFP ont été séparées par une technique similaire à celle utilisée pour le fractionnement mitochondrial de colza, permettant l'isolement de deux fractions nommées IM (matrice + membranes internes) et OM (membranes externes). Les figures 36 et 37 montrent les détections immunologiques de protéines marqueurs tels que la ferrochelatase (marqueur de la membrane interne) et la porine (marqueur de la membrane externe). Leur répartition montre une séparation satisfaisante des membranes mitochondriales dans les conditions utilisées. La détection immunologique des protéines ORF138 et ORF138-GFP montre que la protéine ORF138 peut être détectée dans les fractions IM et OM alors que la protéine ORF138-GFP n'est détectée que dans la fraction OM.

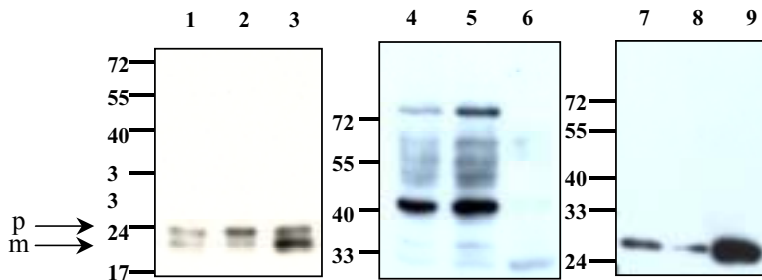
Dans le cas de la détection de l'ORF138, un double signal peut être observé. Il est probable que ces deux signaux correspondent aux formes clivées (ayant perdu la préséquence pre $\beta$ ) et non clivées (n'ayant pas perdu la préséquence pre $\beta$ ) de l'ORF138. Il a été montré que le clivage de la préséquence utilisée est effectué par une enzyme : la MPP (Mitochondrial Processing Protease) localisée dans la matrice (revue par Gakh et al. 2002 et introduction § 3-2-2-1). La forme clivée observée dans les conditions utilisées, aurait donc transité par la matrice mitochondriale.



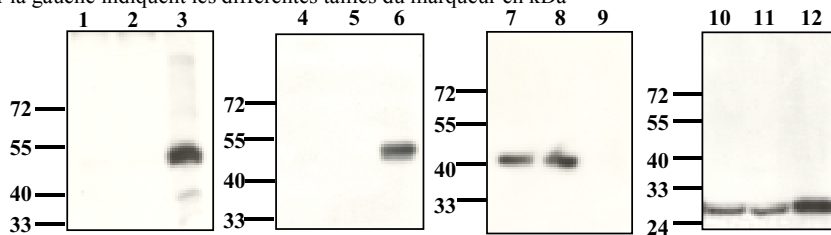
**Figure 34**  
 Détection immunologique des protéines ORF138 (1 à 3) et porine (4 à 6) dans les échantillons issus des traitements alcalins des mitochondries de levure.  
 p : précurseur, m : protéine mature ayant perdu la préséquence preβ  
 Pistes 1 et 4 : échantillon mitochondrial avant traitement  
 Pistes 2 et 5 : fraction soluble après traitement  
 Pistes 3 et 6 : fraction insoluble après traitement  
 Chaque piste contient 6 µg de protéines  
 Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa



**Figure 35**  
 Détection immunologique des protéines ORF138-GFP (à l'aide des anticorps anti-ORF138 : 1 à 3 et anti-GFP : 4 à 6) et porine (7 à 9) dans les échantillons issus des traitements alcalins des mitochondries de levure.  
 Pistes 1, 4 et 7 : échantillon mitochondrial avant traitement  
 Pistes 2, 5 et 8 : fraction soluble après traitement  
 Pistes 3, 6 et 9 : fraction insoluble après traitement  
 Chaque piste contient 6 µg de protéines  
 Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa



**Figure 36**  
 Détection immunologique des protéines ORF138 (1 à 3), ferrochelatase (4 à 6) et porine (7 à 9) dans les échantillons issus des fractionnements mitochondriaux de levure. p : précurseur, m : protéine mature ayant perdu la préséquence preβ  
 Pistes 1, 4 et 7 : échantillon mitochondrial avant fractionnement  
 Pistes 2, 5 et 8 : fraction IM  
 Pistes 3, 6 et 9 : fraction OM  
 Chaque piste contient 5 µg de protéines  
 Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

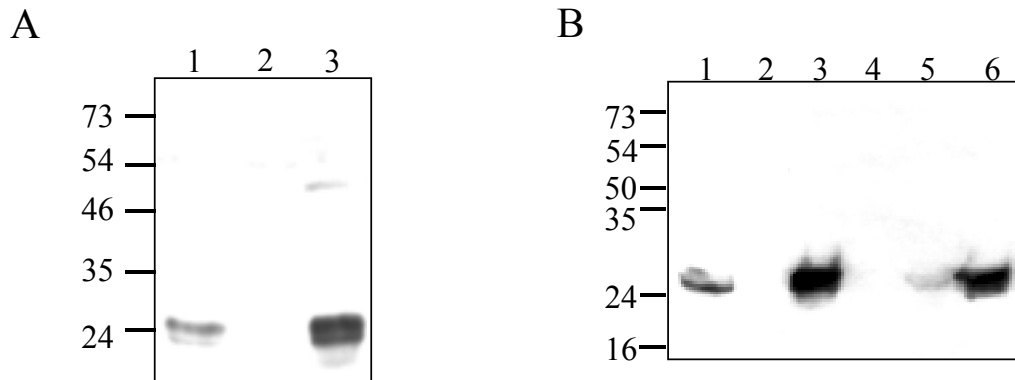


**Figure 37**  
 Détection immunologique des protéines ORF138-GFP (à l'aide des anticorps anti-ORF138 : 1 à 3 et anti-GFP : 4 à 6), ferrochelatase (7 à 9) et porine (10 à 12) dans les échantillons issus des fractionnements mitochondriaux de levure.  
 Pistes 1, 4, 7 et 10 : échantillon mitochondrial avant fractionnement  
 Pistes 2, 5, 8 et 11 : fraction IM  
 Pistes 3, 6, 9 et 12 : fraction OM  
 Chaque piste contient 5 µg de protéines  
 Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

#### **4/ Localisation cellulaire chez *E. coli***

Nous avons montré précédemment que la protéine ORF138 s'associe aux membranes mitochondriales de colza et de levure. Cette association est-elle dépendante de propriétés des membranes mitochondriales ou est-ce un mécanisme tributaire des caractéristiques intrinsèques de l'ORF138 ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le système bactérien.

Dans un premier temps, nous avons voulu discriminer une localisation membranaire d'une localisation dans les corps d'inclusion de la protéine ORF138. Pour ce faire, les cellules exprimant l'ORF138 ont été lysées et les fractions solubles et insolubles séparées par centrifugation. Une détection immunologique de l'ORF138 dans ces échantillons montre que la protéine ORF138 est exclusivement retrouvée dans la fraction insoluble (figure 38A). Cette fraction insoluble est ensuite traitée à l'aide d'un tampon contenant soit un détergent (permettant la solubilisation des protéines membranaires), soit de l'urée (agent chaotrope permettant la solubilisation de protéines présentes dans des corps d'inclusion). Pour chaque traitement, les fractions solubles et insolubles sont séparées par centrifugation. La figure 38B montre la répartition de l'ORF138 dans les différentes fractions récoltées. Nous pouvons observer que la protéine ORF138 est très majoritairement présente dans la fraction soluble après un traitement à l'aide d'un détergent et réciproquement dans la fraction insoluble après un traitement à l'urée. Nous pouvons donc en déduire que le caractère insoluble de la protéine ORF138 est dû à son association aux membranes. Afin de tester si cette association aux membranes s'effectue via le domaine hydrophobe (dont une partie est prédite comme transmembranaire), une étude similaire a été menée sur des bactéries exprimant la protéine ORF138 $\Delta$ 1-43 (forme A). Les figures 39A et 39B montrent la coloration des échantillons ainsi que la détection immunologique de la protéine après électrophorèse en gel d'acrylamide. Nous pouvons observer que l'expression de cette protéine se fait à un niveau bien plus élevé que celui de la protéine entière puisqu'une simple coloration permet sa détection (figure 39A). Cette forte expression ne s'accompagne cependant pas d'une compartimentation cellulaire définie. En effet, il est possible de détecter la protéine dans presque toutes les fractions issues des différents traitements. Le domaine hydrophobe est donc certainement responsable de l'association aux membranes de l'ORF138.



**Figure 38**

Détection immunologique de l'ORF138 dans les échantillons issus du fractionnement chez *E. coli*

A

Piste 1 : échantillon cellulaire avant fractionnement

Piste 2 : fraction soluble après fractionnement

Piste 3 : fraction insoluble après fractionnement

B

Piste 1 : échantillon cellulaire avant fractionnement

Piste 2 : fraction soluble après fractionnement

Pistes 3 à 6 : fraction insoluble après fractionnement

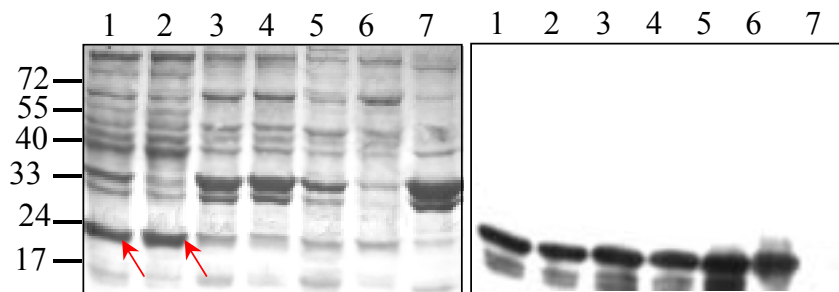
Piste 3 : fraction soluble après traitement au détergent (0,5 % (p/v) n-dodécyl-b-D-malotside)

Piste 4 : fraction insoluble après traitement au détergent

Piste 5 : fraction soluble après traitement à l'urée (8M)

Piste 6 : fraction insoluble après traitement à l'urée

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa



**Figure 39**

Coloration des protéines au bleu de coomassie (A) et détection immunologique (B) de l'ORF138 $\Delta$ 1-43 dans les échantillons issus du fractionnement chez *E. coli*

Les flèches rouges désignent la protéine ORF138 $\Delta$ 1-43 visible en coloration au bleu de coomassie

Piste 1 : échantillon cellulaire avant fractionnement

Piste 2 : fraction soluble après fractionnement

Piste 3 : fraction insoluble après fractionnement

Pistes 4 à 7 : fraction insoluble après fractionnement

Piste 4 : fraction soluble après traitement au détergent (0,5 % (p/v) n-dodécyl-b-D-malotside)

Piste 5 : fraction insoluble après traitement au détergent

Piste 6 : fraction soluble après traitement à l'urée (8M)

Piste 7 : fraction insoluble après traitement à l'urée

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

La localisation membranaire de la protéine chez *E. coli* a donc été démontrée. La bactérie *E. coli* étant une bactérie de type Gram-, elle comprend deux membranes : la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Afin de préciser la localisation membranaire de l'ORF138, une séparation des membranes cytoplasmique et externe a été effectuée. Les densités des deux membranes étant différentes, leur séparation par centrifugation sur un gradient de saccharose est donc possible. Deux fractions sont ainsi récoltées, la première, de couleur brun foncé située au-dessus de la couche à 45% de saccharose (nommée S45) et la deuxième de couleur brun clair située à l'interface 68%/45% saccharose (nommée S68). Consécutivement à cet isolement, la qualité de la séparation ainsi que la répartition de l'ORF138 ont été étudiées. L'activité enzymatique de la NADH oxydase (marqueur de la membrane cytoplasmique) et la répartition du KDO (lipopolysaccharide marqueur de la membrane externe) ont servi à tester la bonne séparation des membranes par la méthode utilisée. Les résultats montrent (tableau 2) que les fractions isolées sont bien enrichies en composés spécifiques de chacune des membranes. L'enrichissement de l'ORF138 dans la fraction S45 (telle que montrée sur la figure 40A) nous permet de déduire que l'insertion de l'ORF138 au niveau des membranes s'effectue dans la membrane cytoplasmique de la bactérie.

La dernière étape de ce travail a consisté à déterminer si la protéine ORF138 était intrinsèque à la membrane. Des traitements alcalins des membranes cytoplasmiques ont donc été effectués et la répartition de l'ORF138 observée (figure 40B). La protéine ORF138 se retrouve exclusivement dans la fraction insoluble de ce traitement, elle est donc intrinsèque aux membranes cytoplasmiques chez *E. coli*.

Dans ce chapitre, nous avons pu prouver la localisation membranaire de l'ORF138 dans tous les systèmes utilisés (figure 34,35 et 40B). En effet, nous avons pu observer l'association de l'ORF138 aux membranes internes de mitochondries de colza, aux membranes internes et externes des mitochondries de levure et aux membranes cytoplasmiques de bactérie. Il semble donc que cette association aux membranes soit une caractéristique essentielle de la protéine. De plus, cette liaison est toujours une association forte puisque la protéine est toujours intrinsèque à la membrane.

	activité spécifique NADH oxydase	Proportion de KDO
<b>1</b>	<b>1,21</b>	<b>1,83</b>
<b>2</b>	<b>0,09</b>	<b>3,05</b>
<b>3</b>	<b>2,29</b>	<b>0,78</b>

**Tableau 2**

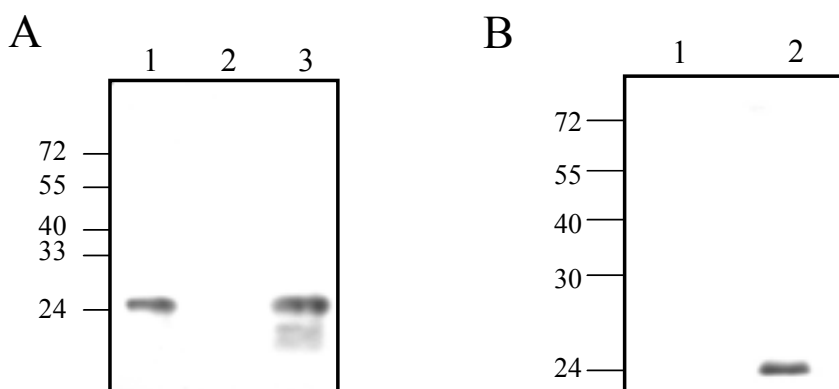
Activités NADH oxydase et quantité de KDO dans les échantillons issus du fractionnement de membranes d'*E. coli*

1 : échantillon avant fractionnement des membranes

2 : échantillon S68

3 : échantillon S45

L'activité spécifique NADH oxydase est exprimée en  $\mu\text{mol}$  de substrat oxydé par minute et par  $\mu\text{g}$  de protéine. La proportion de KDO est quantité en  $\mu\text{g}$  pour 100  $\mu\text{g}$  de protéines.



**Figure 40**

A : Détection immunologique de l'ORF138 dans les échantillons issus du fractionnement de membrane d'*E. coli*

Piste 1 : échantillon avant fractionnement des membranes

Piste 2 : échantillon S68

Piste 3 : échantillon S45

Chaque piste contient 5  $\mu\text{g}$  de protéines

B : Détection immunologique de l'ORF138 après un traitement alcalin des membranes cytoplasmiques de *E. coli*

Piste 1 : fraction soluble après traitement

Piste 2 : fraction insoluble après traitement

Chaque piste contient 5  $\mu\text{g}$  de protéines

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

Ces résultats nous permettent d'émettre des hypothèses pour comprendre l'absence de signal GFP dans les bactéries exprimant la protéine de fusion ORF138-GFP (cf paragraphe I-2). En effet, si on postule que la localisation de la protéine de fusion est identique à celle de l'ORF138, la protéine GFP peut donc se retrouver dans le compartiment cytoplasmique (configuration "C in" de l'ORF138) ou dans le compartiment périplasmique (configuration "C out" de l'ORF138). L'absence de fluorescence GFP peut ainsi être expliquée par une localisation périplasmique de la GFP. En effet, il a été démontré que les conditions physico chimiques de ce compartiment ne permettent pas la fluorescence de la GFP (Drew et al. 2002). Cette propriété peut être utile pour tester la topologie de la protéine ORF138 à l'aide de fusions traductionnelles. Des expériences sont en cours pour construire les gènes codant les protéines GFP-ORF138 mais aussi ORF138-PHOA et PHOA-ORF138. En effet, la protéine PHOA (phosphatase alcaline) est une enzyme qui n'est active que dans l'espace périplasmique et a été largement utilisée pour déterminer la topologie de nombreuses protéines membranaires (Kato et al. 2001; Drew et al. 2002 ; Behrendt et al. 2004; Gandlur et al. 2004).

La protéine ORF138, au sein de la mitochondrie de colza, est localisée dans la membrane interne. Les associations moléculaires au sein de cette membrane sont potentiellement des éléments nécessaires à son action.

## **CHAPITRE III**

# **ASSOCIATIONS MOLECULAIRES DE L'ORF138**



Nous avons montré les différentes caractéristiques de la protéine ainsi que sa localisation dans les systèmes étudiés. Dans ce chapitre, nous étudierons les interactions moléculaires qui existent entre la protéine et de possibles partenaires. En effet, ces associations moléculaires potentielles peuvent nous permettre de proposer des hypothèses quant à l'implication de l'ORF138 sur le phénotype mâle stérile. C'est pourquoi nous avons testé dans un premier temps l'association de la protéine ORF138 avec elle-même, puis avec d'autres protéines et enfin avec des acides nucléiques.

## **1/ Oligomérisation de l'ORF138**

Les résultats antécédents (Grelon 1994, figure 32 et annexe 7) ont montré que les détections immunologiques de l'ORF138 révèlent la présence de formes dimériques. Ces formes dimériques peuvent être observées dans des conditions réductrices et dénaturantes dans des extraits de protéines de colza, de levure et de bactéries exprimant l'ORF138 (annexe 7). De plus des expériences de synthèse *in vitro* des protéines ORF138, ORF138 $\Delta$ 1-43 et ORF138 $\Delta$ 58-138 ont montré que ces trois protéines pouvaient se dimériser spontanément (voir les détails en annexe 7).

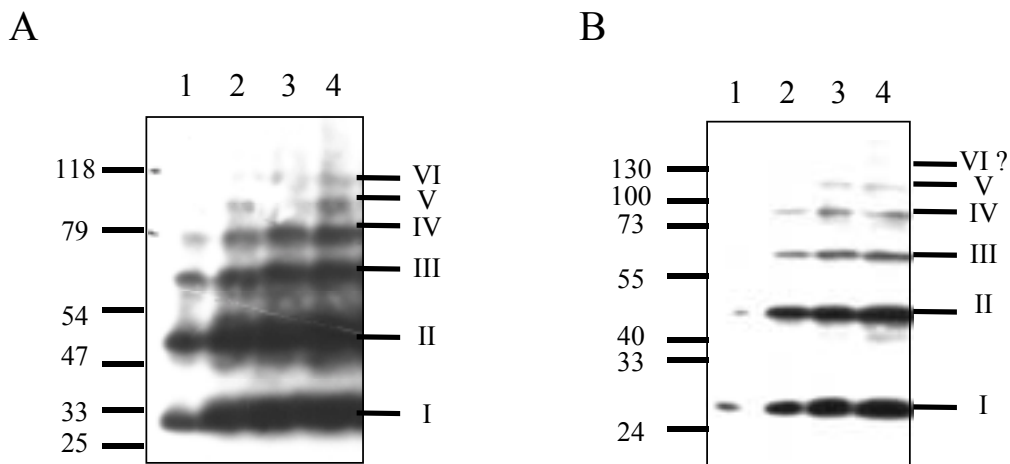
Nous avons donc entrepris d'étudier la capacité de l'ORF138 à former des structures dimériques voire oligomériques dans des extraits mitochondriaux de colza. Pour ce faire, un extrait mitochondrial de plantules étiolées de colza a été traité par un agent dénaturant mais sans agent réducteur et sans chauffage afin de préserver au maximum les différentes formes de l'ORF138. Puis des quantités croissantes de protéine ont été déposées sur gel d'acrylamide pour effectuer la séparation des protéines.

La détection immunologique effectuée à l'aide de l'anticorps anti-ORF138 nous permet d'observer la présence de plusieurs formes oligomériques allant jusqu'à la forme hexamérique dans ces conditions (figure 41A). Lorsque l'expérience est répétée en chauffant l'échantillon, les quantités de formes hexamériques et pentamériques diminuent substantiellement (figure 41B) laissant supposer que les interactions permettant l'établissement de ces formes sont des interactions faibles. Si l'échantillon est traité à la chaleur et qu'un agent réducteur est ajouté, comme c'est le cas dans la plupart des analyses, nous pouvons observer la disparition des formes tétramériques et trimériques et d'une partie des formes dimériques (figure 32). Ce résultat suggère que les tétramères et trimères ainsi qu'une certaine proportion des dimères sont stabilisés par des ponts disulfures.

Afin de confirmer l'établissement de ces liaisons faibles dans la formation de ces structures oligomériques, des molécules peuvent être utilisées pour stabiliser les différentes formes fugaces (crosslinker). Pour ce faire, nous avons utilisé le diméthylpimélimidate (DMP) pour stabiliser les oligomères. Des quantités croissantes de DMP ont donc été utilisées directement sur une préparation de mitochondries limitant ainsi les liaisons non spécifiques, dans des conditions de faible (éthanolamine pH 9,0) et forte (triéthanolamine pH 8,0) stringence comme décrit dans les matériels et méthodes (paragraphe 2-2-1-4-1).

La figure 42 montre la détection immunologique des différentes formes oligomériques. Nous pouvons observer que les formes oligomériques identifiées dans des conditions faiblement dénaturantes peuvent être stabilisées et conservées après action d'un crosslink quelque soit les conditions de stringence et ce même après un traitement dans des conditions dénaturantes et réductrices.

Ces résultats sur la formation d'homooligomères de l'ORF138 peuvent nous amener à nuancer les résultats obtenus sur la topologie de l'ORF138 dans les membranes internes mitochondriales. En effet, cette structure oligomérique peut être un élément permettant d'expliquer la résistance de l'ORF138 à une attaque protéolytique. Nous pouvons penser que la formation de ces associations moléculaires ne permet pas l'accès aux résidus par la peptidase. Il est donc nécessaire de caractériser plus précisément la topologie de l'ORF138 dans les membranes ainsi que ses éventuelles associations moléculaires.



**Figure 41**

Détection immunologique des formes oligomériques de l'ORF138 dans les mitochondries de colza mâle stérile.

A : Echantillons non chauffés - B : Echantillons chauffés

Piste 1 : 5 µg de protéines

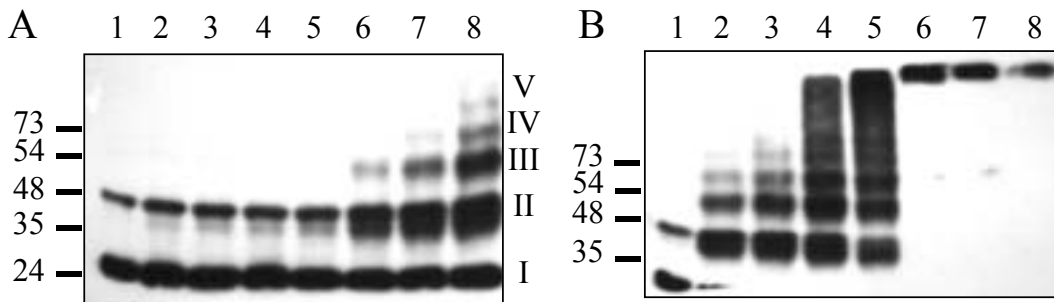
Piste 2 : 15 µg de protéines

Piste 3 : 45 µg de protéines

Piste 4 : 145 µg de protéines

Les chiffres romains sur la droite indiquent le niveau d'oligomérisation ( I = monomère, II = dimère, III = trimère etc ...)

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa



**Figure 42**

Détection immunologique des formes oligomériques de l'ORF138 dans les mitochondries de colza mâle stérile après traitement au DMP (diméthylpimélimidate).

A : Traitement effectué dans 200 mM d'éthanolamine pH 9,0

B : Traitement effectué dans 200 mM de triéthanolamine pH 8,0

Piste 1 : 0 mM DMP - Piste 2 : 0,05 mM DMP - Piste 3 : 0,2 mM DMP - Piste 4 : 0,5 mM DMP

Piste 5 : 1 mM DMP - Piste 6 : 5 mM DMP - Piste 7 : 10 mM DMP - Piste 8 : 20 mM DMP

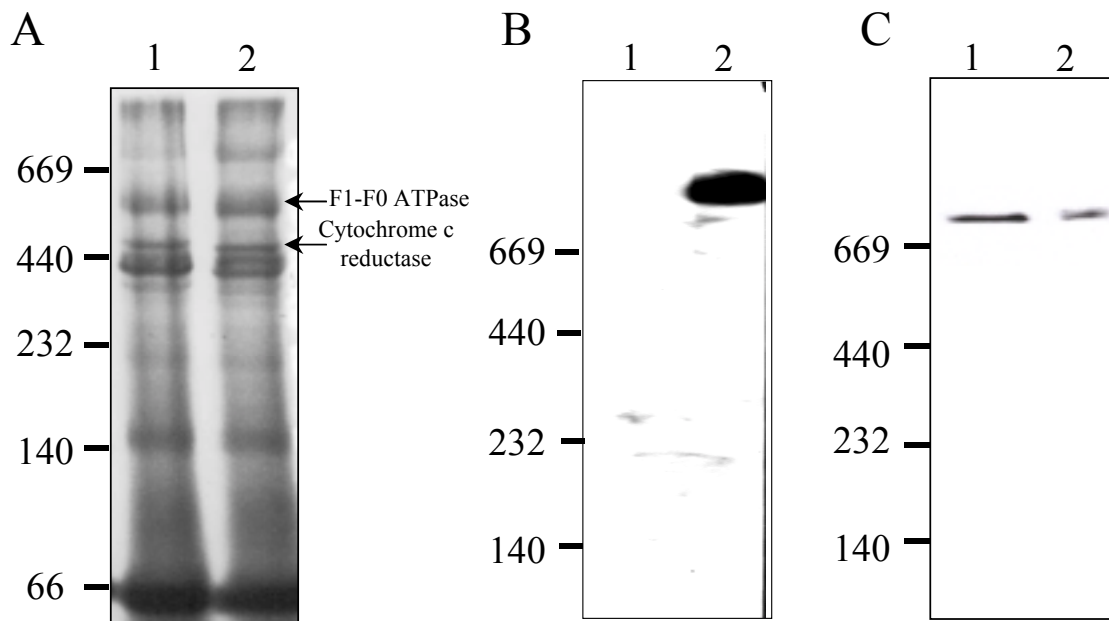
Les chiffres romains sur la droite indiquent le niveau d'oligomérisation ( I = monomère, II = dimère, III = trimère etc ...)

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

## **2/ Identification d'un complexe de haut poids moléculaire contenant l'ORF138**

Ayant démontré la capacité de la protéine à former des structures oligomériques, nous avons également porté nos efforts sur l'étude d'autres interactions protéine-protéine qui pourraient se produire au sein de la membrane interne mitochondriale. Des travaux effectués sur des protéines de différentes stérilités mâles cytoplasmiques ont suggéré que les protéines étudiées pouvaient être impliquées dans des interactions avec des complexes de la chaîne respiratoire (Sabar et al. 2003; Ducos et al. 2001; Hanson et al. 2004) . Ces travaux nous ont conduits à rechercher la présence d'un complexe protéique impliquant la protéine ORF138. Pour ce faire, des expériences de blue native PAGE ont été effectuées.

La technique de blue native PAGE est une technique d'électrophorèse de complexes protéiques conservés dans leur état natif. Les complexes protéiques mitochondriaux sont ainsi séparés par leur poids moléculaire (Schagger et al. 1991; Schagger et al. 1994; Jansch et al. 1996). Des mitochondries de plantules étiolées ainsi que de boutons floraux de colzas fertile et stérile ont été lysées puis les complexes protéiques ont été séparés comme décrit dans les matériels et méthodes (cf paragraphe 2-2-2-2). Une coloration des complexes protéiques permet d'observer la bonne séparation des différents complexes mitochondriaux (complexes III et V notamment) (figure 43A). Cependant les observations effectuées n'ont pas permis de repérer de différences significatives entre les profils protéiques de colza fertile et stérile à partir de mitochondries provenant des deux organes étudiés (figure 43A). Néanmoins lorsqu'une révélation immunologique de l'ORF138 est effectuée (après un transfert des protéines sur membrane en conditions dénaturantes ou natives), un complexe de poids moléculaire supérieur à 750 kDa peut être observé (figure 43B). Connaissant la taille du complexe protéique impliquant l'ORF138, une observation plus attentive des complexes présents à la taille repérée ne nous permet pas d'observer de complexe présent dans les échantillons issus de colza stérile et absent dans les échantillons issus de colza fertile. Le complexe moléculaire engageant l'ORF138 semble donc être peu abondant (figure 43A).



**Figure 43**

A : coloration au bleu de coomassie de complexes protéiques mitochondriaux après séparation en blue native PAGE

Les flèches montrent les complexes F1-F0 ATPase et cytochrome c réductase selon leur tailles théoriques.

B : Détection immunologique de la protéine ORF138 dans des échantillons mitochondriaux après séparation en blue native PAGE

C : Détection immunologique de la protéine CPN60 dans des échantillons mitochondriaux après séparation en blue native PAGE

Piste 1 : Echantillon mitochondrial de plantule étiolée de colza fertile

Piste 2 : Echantillon mitochondrial de plantule étiolée de colza mâle stérile

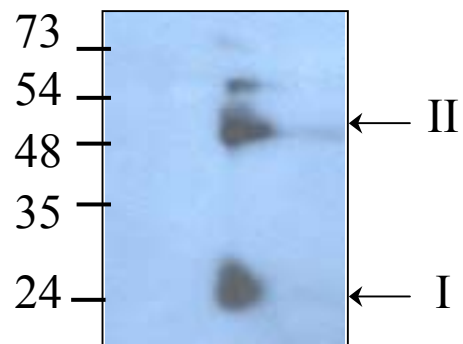
Des observations similaires ont été effectuées sur des échantillons mitochondriaux de boutons floraux

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

En témoin, une détection du complexe protéique impliquant la protéine matricielle CPN60 a également été effectuée et on peut observer que sa taille théorique (750 kDa) (Jansch et al. 1996) correspond bien à la taille observée (figure 43C). Ce dernier ne colocalise pas avec le complexe protéique comprenant l'ORF138, nous permettant de confirmer que ce dernier possède une taille supérieure à 750 kDa. Cette observation n'est pas contradictoire avec la localisation de l'ORF138 dans les membranes internes.

Le complexe faisant intervenir l'ORF138 possède une taille supérieure à la majorité des complexes mitochondriaux présents dans la membrane interne et cette taille est bien supérieure à la taille des hexamères observés auparavant. Nous avons donc tenté d'identifier les différents composants de ce complexe moléculaire. Dans ce but, la stratégie adoptée est la séparation des protéines présentes dans le gel à la taille du complexe identifié (deuxième dimension). Lorsqu'une deuxième dimension est effectuée en conditions dénaturantes, c'est à dire en découpant la bande d'intérêt repérée antérieurement sur le gel de blue native PAGE et en la traitant pour dénaturer les complexes protéiques, une révélation immunologique permet de détecter la présence de l'ORF138 (figure 44). Aucune technique de coloration (coomassie ou coloration à l'argent) n'a cependant permis l'identification de bandes correspondant à de possibles partenaires (résultats non montrés). Ceci confirme bien la très faible abondance du complexe protéique mettant en jeu l'ORF138. Cette très faible abondance ne nous interdit cependant pas la détection immunologique de l'ORF138.

Afin de permettre une identification des protéines présentes dans ce complexe protéique, une bande correspondant à la taille identifiée sur le gel de BN-PAGE a été découpée et soumise à une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (Luc Négroni, Plate-forme de Protéomique du Moulon, UMR de Génétique Végétale, Ferme INRA du Moulon, Gif sur Yvette). Des protéines composant des complexes dont la taille avoisine celle du complexe impliquant l'ORF138 ont pu être identifiées (complexes catalase et Glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase). Nous ne pouvons cependant pas supposer que l'ORF138 est engagée dans ces complexes protéiques car leur localisation cellulaire est respectivement peroxysomale et cytoplasmique. La méthode de séparation utilisée est néanmoins ainsi validée.



**Figure 44**

Détection immunologique de la protéine ORF138 lors d'une deuxième dimension dénaturante effectuée sur un morceau de gel découpé après séparation en blue native PAGE.

I : monomère de l'ORF138

II : dimère de l'ORF138

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

De plus, le profil de digestion trypsique de l'ORF138 ne permet pas sa détection par l'analyse spectrométrique (les peptides générés sont de tailles inférieures à la résolution de la spectrométrie). Nous pouvons alors supposer que si l'ORF138 est associée à d'autres protéines mitochondriales, l'abondance de ce complexe protéique est plus faible que celle des complexes contaminants. Nous pouvons également présumer que le profil de digestion trypsique des partenaires protéiques potentiels ne permette pas leur détection. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que l'ORF138 soit la seule protéine impliquée dans ce complexe de très haut poids moléculaire.

Nous avons bien montré la présence d'un complexe de très haut poids moléculaire impliquant l'ORF138 dans les mitochondries de colza. Toutefois, nous n'avons pas jusqu'à aujourd'hui réussi à identifier les partenaires protéiques potentiellement impliqués dans la formation de ce complexe s'ils existent. Nous avons donc étudié d'autres associations moléculaires possibles, notamment celles qui pourraient mettre en jeu des acides nucléiques.

### **3-/ Etude de la liaison de l'ORF138 à des acides nucléiques**

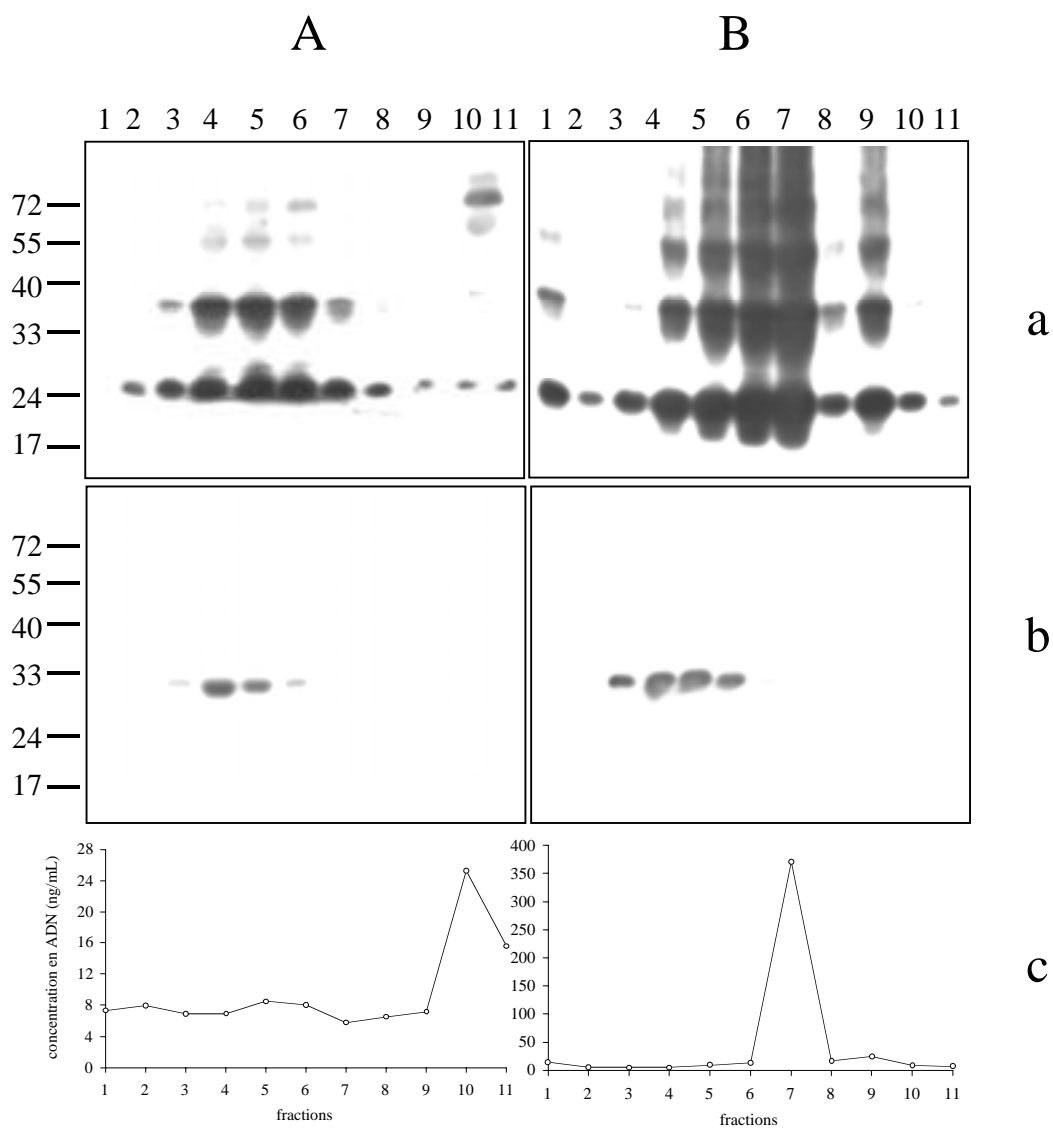
L'observation de la séquence primaire de l'ORF138 nous permet de constater que le domaine majoritairement hydrophile (plus précisément les acides aminés 94 à 132) contenant 3 répétitions du motif KGEIEGKEEKKE est un domaine constitué de nombreux acides aminés hydrophiles et chargés pouvant potentiellement intervenir dans la liaison avec un acide nucléique.

Nous nous sommes basés sur les travaux de Kaufman et son équipe qui ont identifié plusieurs protéines bifonctionnelles impliquées dans le complexe nucléoprotéique des mitochondries (le nucléoïde) chez la levure (Kaufman et al. 2000). L'approche menée ici consiste à stabiliser une interaction entre acides nucléiques et protéines à l'aide de formaldéhyde puis de purifier des fractions nucléoprotéiques sur un gradient de chlorure de césium. La comparaison du comportement de protéines d'intérêt entre un échantillon non traité et un échantillon traité permet de conclure quant à leur implication dans une liaison aux acides nucléiques.



Des mitochondries de plantules étiolées de colza stériles sont donc soumises au traitement au formaldéhyde pendant une nuit. Après arrêt de la réaction, les mitochondries sont lysées à l'aide d'un détergent non ionique afin de préserver les complexes nucléoprotéiques. Une fraction enrichie en nucléoides est ensuite isolée par ultracentrifugation sur un coussin de saccharose puis les complexes nucléoprotéiques sont dissociés par l'utilisation d'un détergent ionique. Les protéines liées aux acides nucléiques par le traitement au formaldéhyde sont séparées des protéines libres par séparation des acides nucléiques sur un gradient de chlorure de césium. Les fractions récoltées après centrifugation sont chauffées afin que la liaison au formaldéhyde soit rompue.

Les protéines sont ensuite analysées par la technique de SDS PAGE alors que les acides nucléiques sont extraits au phénol chloroforme, précipités à l'éthanol et leur concentration dosée dans les différentes fractions. La figure 45 montre la détection immunologique des protéines ORF138 et porine dans les fractions récoltées à partir des échantillons traités et non traités et révèle la répartition des acides nucléiques dans les mêmes fractions. On peut constater que la répartition de la protéine ORF138 le long du gradient de chlorure de césium change entre les échantillons traités et non traités. De plus l'ORF138 est retrouvée dans les mêmes fractions que les acides nucléiques après traitement suggérant l'existence d'une liaison. Ceci n'est pas observé pour la porine. Le changement de répartition de l'ORF138 dans le gradient de chlorure de césium peut également être dû à la stabilisation de plusieurs oligomères d'ORF138 par le formaldéhyde. C'est pourquoi la colocalisation de l'ORF138 et des acides nucléiques dans les mêmes fractions ne nous permet pas de conclure sur la liaison entre l'ORF138 et des acides nucléiques mitochondriaux. Néanmoins ces résultats préliminaires sont encourageants pour les travaux à venir et ouvrent une piste intéressante à suivre.



**Figure 45**

Détection immunologique des protéines ORF138 (a) et porine (b) et dosage d'ADN (c) dans les fractions issues d'un traitement au formaldéhyde et séparées à l'aide d'un gradient de chlorure de césium. Fraction 1 = haut du gradient, Fraction 11 = bas du gradient.

A : échantillons non traités

B : échantillons traités avec 1% (p/v) de formaldéhyde

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

## **CHAPITRE IV**

# **VERS UN ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'ORF138 ?**

Nous avons étudié les propriétés structurales de l'ORF138, sa localisation intracellulaire dans les systèmes utilisés et les possibles associations moléculaires qui sont mises en jeu. Toutes les informations recueillies contribuent à la connaissance des caractéristiques essentielles de la protéine. Afin d'utiliser ces informations pour comprendre le mécanisme de stérilité, il est nécessaire de conduire des approches plus intégrées (donc moins réductrices) du phénomène à l'échelle cellulaire ou de l'organe. La situation idéale serait de pouvoir reproduire la stérilité mâle dans des plantes transgéniques. Nous pouvons également exploiter les données physiologiques obtenues dans les systèmes hétérologues.

En s'appuyant sur les résultats obtenus précédemment dans l'équipe, les deux approches ont été explorées.

## **1-/ Résultats antécédents obtenus au laboratoire**

### **1-1/ Tentatives de production de plantes mâle stériles par transgénèse**

La modification de la protéine ORF138 *in planta* n'est pas possible aujourd'hui. En effet, la transformation génétique des mitochondries n'est pas disponible. De plus, la transformation génétique du colza est longue et laborieuse. Il a donc été choisi d'essayer de mimer la SMC Ogura chez *A. thaliana* et *N. tabacum* par transformation nucléaire. Si l'expression de la protéine ORF138 provoque une stérilité mâle chez *A. thaliana* et *N. tabacum*, différentes formes tronquées ou mutées de la protéine pourraient ainsi être testées.

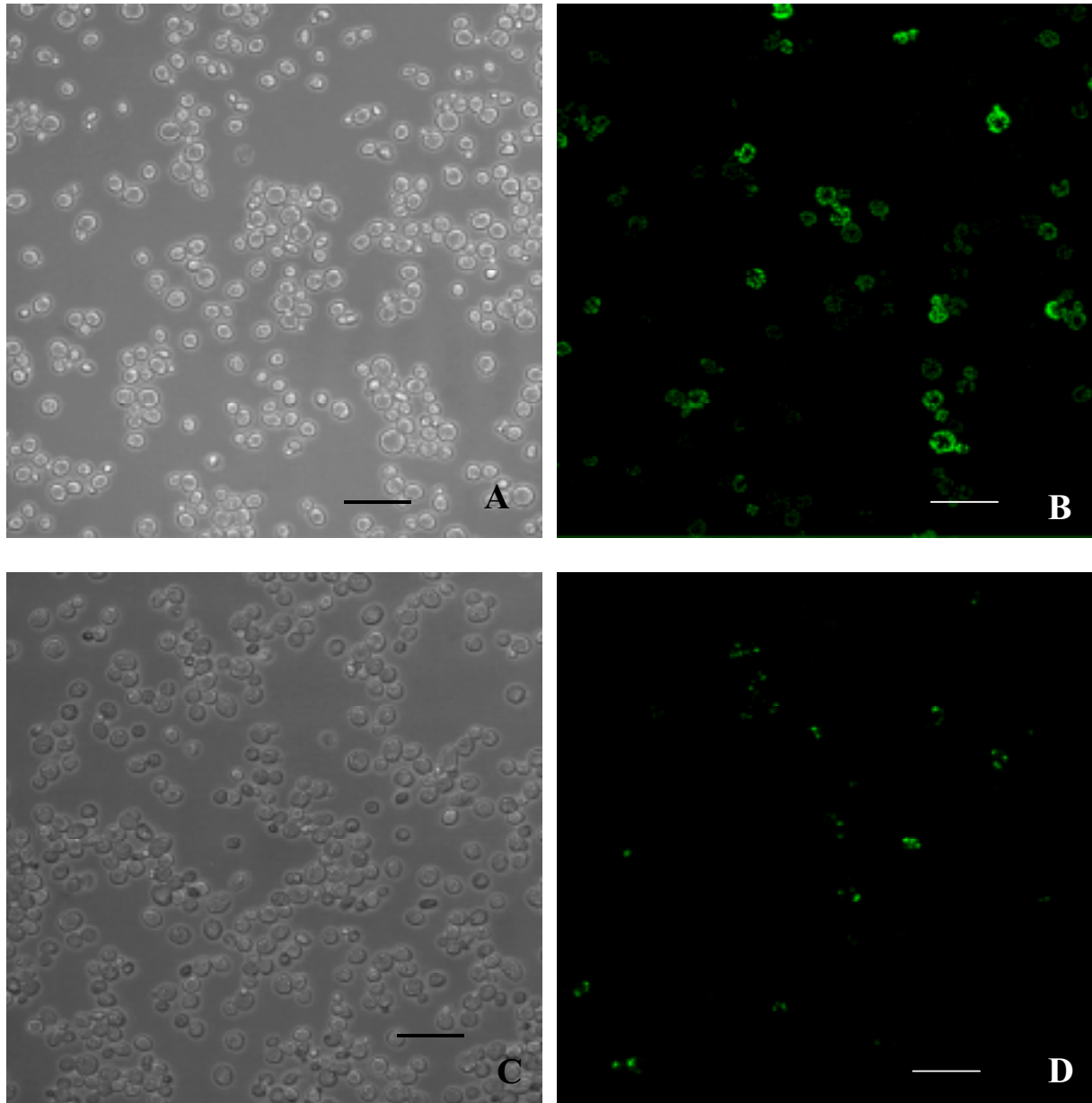
La transformation nucléaire des plantes nous contraint donc à exprimer l'ORF138 fusionnée avec une préséquence d'adressage mitochondriale. La séquence du peptide signal de la sous unité  $\beta$  de l'ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia* (pre $\beta$ ) identique à celui utilisé pour l'expression chez la levure a donc été utilisée. La construction de vecteurs binaires permettant l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138 sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV mais aussi sous le contrôle du promoteur TA29 a été réalisée. Le promoteur TA29 (Koltunow et al. 1990) est un promoteur spécifique de l'assise tapétale. Dans un premier temps, la séquence non modifiée du gène *orf138* a été utilisée et des transformations génétiques de l'écotype WS d'*A. thaliana* et de *N. tabacum* cv Xanthi ont été entreprises (Grelon 1995).

Ces expériences n'ont pas permis d'observer une stérilité mâle corrélée à la présence du transgène. Dans les plantes de tabac transgéniques obtenues avec la construction contenant le promoteur 35S du CaMV, aucun ARN messager de l'*orf138* n'était détectable (Grelon 1995). Ces résultats ont conduit à l'obtention d'une séquence modifiée de l'*orf138* dont le pourcentage en AT est diminué et ne présentant plus le site putatif de polyadénylation détectable dans la séquence mitochondriale. De nouvelles constructions ont été réalisées avec cette séquence modifiée (qui est également celle qui a été introduite dans les levures), et utilisées pour obtenir des plantes d'*A. thaliana* transgéniques (annexe 7). Plusieurs transformants indépendants ont été obtenus pour ces différentes constructions. Cependant, aucune n'a permis l'obtention d'une proportion significative de plantes mâle stériles (par rapport aux proportions observées généralement dans ce type d'expérience) dans les générations T1 et T2. Cependant, il a déjà été montré que le promoteur 35S était peu actif dans les cellules du tapis (Medberry et al. 1992). Ceci peut expliquer l'absence de plantes mâle stériles dans ce cas. L'activité du promoteur TA29 semble être, elle aussi, très faible. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur l'effet de l'ORF138 sur les cellules tapétales d'*A. thaliana*.

### 1-2/ observation de morphologies mitochondriales chez la levure.

L'expression de l'ORF138 chez *A. thaliana* ne conduit pas à une stérilité mâle. Bien que les conditions utilisées puissent être améliorées (notamment par l'utilisation d'autres promoteurs), il a été choisi d'utiliser un système hétérologue eucaryote (la levure *S. cerevisiae*) pour également tester l'effet de l'ORF138 sur la morphologie mitochondriale.

Les observations de souches de levure exprimant les protéines pre $\beta$ -GFP et pre $\beta$ -ORF138-GFP sous un microscope à épi-fluorescence après une culture en absence de méthionine ont été réalisées (figure 46). Les cellules de levure exprimant la protéine pre $\beta$ -GFP montrent de nombreux organites fluorescents organisés en réseau tubulaire et ramifié, comme décrit dans la littérature (Westermann et al. 2000 ; Dimmer et al. 2002). Par contre, les cellules exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP montrent une fluorescence condensée en un (parfois 2) globules. Il est également à noter que les cellules qui portent la construction pre $\beta$ -*orf138-gfp* et présentant une fluorescence détectable sont moins nombreuses que celles qui portent la construction pre $\beta$ -*gfp* (annexe 7).



**Figure 46**

Observations effectuées au microscope confocal sur des cellules de levure exprimant la protéine preβ-GFP (A et B) et exprimant la protéine preβ-ORF138-GFP (C et D).

A et C : vues en transmission

B et D : vues en fluorescence

La barre d'échelle correspond à 20 μm

C'est donc au vu de ces résultats que nous avons entrepris différentes approches permettant de répondre aux questions suivantes : l'expression de l'ORF138 dans les cellules tapétales d'*A. thaliana* provoque-t-elle une stérilité mâle ? L'expression de l'ORF138 dans les cellules végétales conduit elle à des altérations de morphologie mitochondriale ? Peut on identifier des effets de l'ORF138 sur le métabolisme mitochondrial ?

## **2-/ L'expression de l'ORF138 dans les cellules tapétales d'*A. thaliana* provoque-t-elle une stérilité mâle ?**

Nous avons vu ci-dessus que l'expression de l'ORF138 sous le contrôle des promoteurs 35S et TA29 n'a pas permis la production de plantes mâle stériles. C'est pourquoi nous avons cloné puis utilisé un autre promoteur spécifique de l'assise tapétale pour permettre l'expression de l'ORF138 dans ce tissu.

Paul et ses collaborateurs (Paul et al. 1992) ont identifié le gène A9 chez l'écotype Ler d'*A. thaliana*. Ce gène est fortement exprimé dans les cellules tapétales juste avant la méiose des cellules sporogènes et son expression s'éteint lors de la première mitose pollinique. Le clonage du promoteur, ainsi que la stratégie de clonage utilisée pour permettre l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138 dans l'assise tapétale sont détaillés sur l'annexe 6. Plus de 40 transformants indépendants ont été obtenus . La fertilité de ces transformants a été observée et nous n'avons pas pu identifier d'individus présentant une stérilité mâle. Par ailleurs, nous avons essayé de détecter l'ORF138, dans de nombreux extraits protéiques provenant de plantes transformées censées l'exprimer, sans succès. Nous verrons ultérieurement que l'activité des promoteurs utilisés est néanmoins conforme à ce qui est décrit dans la littérature. Il est à noter que des ARN messagers correspondants ont pu être détectés dans les mêmes échantillons (données non décrites). Nous pouvons donc supposer que des phénomènes post-traductionnels empêchent la détection de la protéine ORF138.

Les tentatives pour provoquer une stérilité mâle chez *A. thaliana* par transgénèse n'ont pas donné les résultats escomptés. Néanmoins différentes constructions ont été créées en parallèle pour permettre l'observation de morphologies mitochondriales.

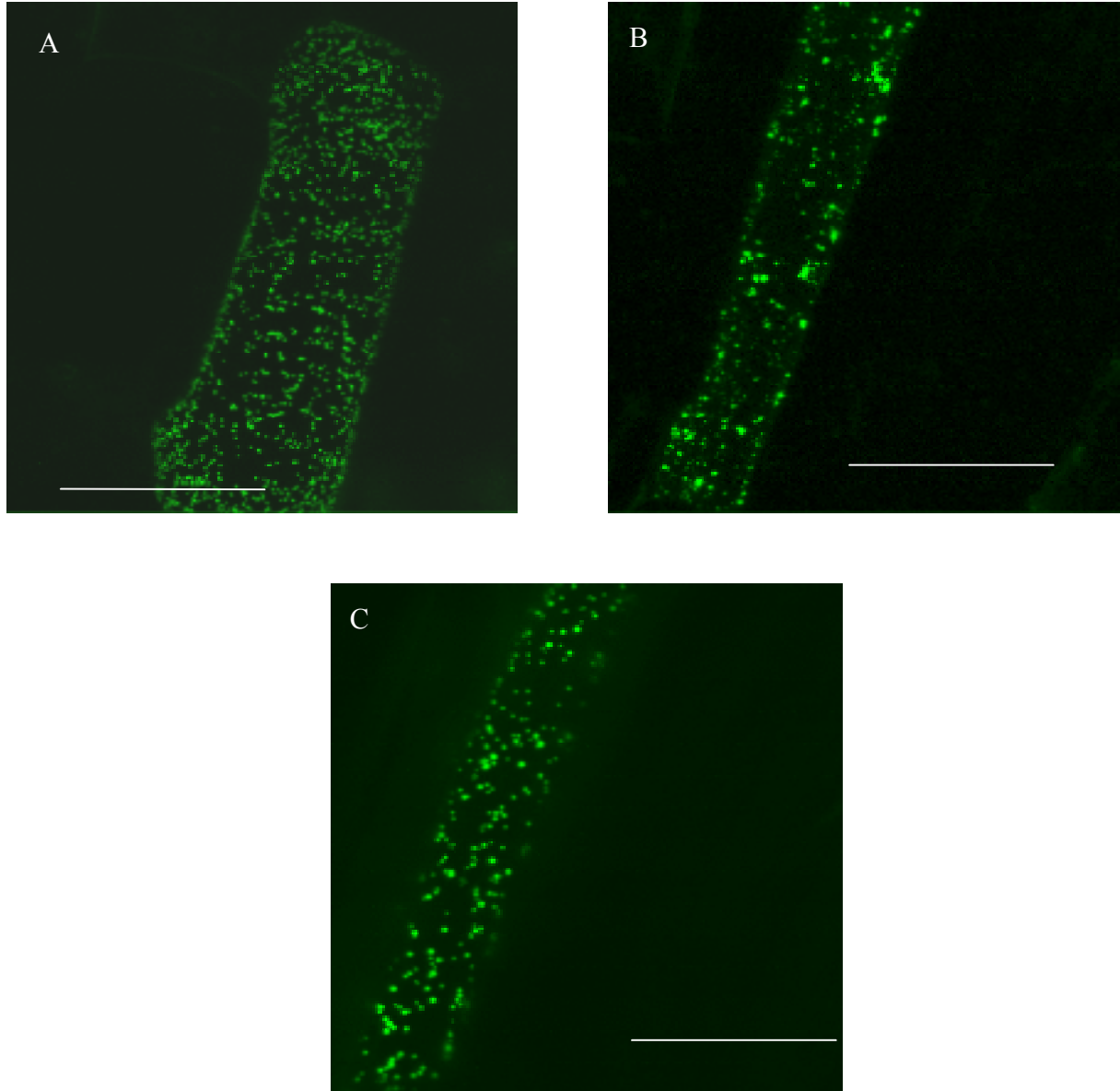
### **3-/ l'expression de l'ORF138 dans les cellules végétales conduit elle à des altérations de morphologie mitochondriale ?**

#### **3-1/Transformation transitoire de cellules d'épiderme d'oignon**

Afin de déterminer si l'expression des protéines pre $\beta$ -ORF138 et pre $\beta$ -ORF138-GFP, provoque une altération de la morphologie mitochondriale dans les cellules végétales, nous avons réalisé des expressions transitoires dans des cellules d'épiderme d'oignon par biolistique. Des vecteurs permettant l'expression des gènes pre $\beta$ -*gfp*, pre $\beta$ -*orf138* et pre $\beta$ -*orf138-gfp* sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV ont été utilisés (respectivement les plasmides D1, D2 et D3) (annexe 6). L'examen des cellules sous microscope à épifluorescence a permis l'observation des morphologies mitochondriales après bombardement avec les plasmides D1 ; D1 et D2 ; ou D3 (figure 47). Dans les cellules exprimant la protéine pre $\beta$ -GFP, la fluorescence est détectée sous forme de ponctuations de taille variable. Ce marquage est identique à d'autres travaux ayant permis un marquage spécifique des mitochondries (Arimura et al. 2004). Dans les cellules exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP, la fluorescence apparaît dans des ponctuations de tailles beaucoup plus hétérogènes avec de gros amas suggérant l'aggrégation de certaines mitochondries (figure 47B). Dans les cellules coexprimant les protéines pre $\beta$ -ORF138 et pre $\beta$ -GFP, la répartition de la fluorescence semble intermédiaire entre les deux situations décrites auparavant (figure 47C). En effet, le nombre de ponctuations semble être moins important que celui observé dans les cellules exprimant la protéine pre $\beta$ -GFP, et leur taille est moins hétérogène que celle des ponctuations présentes dans les cellules exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP.

Il semble donc que l'expression de la protéine ORF138 dans les cellules végétales entraîne une altération de la morphologie mitochondriale comparable à celle observée dans les cellules de levure. Afin de confirmer ces observations, nous avons utilisé les plantes disponibles au laboratoire permettant l'expression de la protéine pre $\beta$ -GFP sous le contrôle du promoteur 35S et nous avons aussi généré des plantes transgéniques permettant l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur 35S et l'expression des protéines pre $\beta$ -GFP et pre $\beta$ -ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur A9.





**Figure 47**

Observations microscopiques de cellules d'épiderme d'oignon exprimant les protéines preβ-GFP (A), preβ-ORF138-GFP (B) et preβ-GFP + preβ-ORF138 (C). La barre d'échelle représente 50 μm

### 3-2/Transformation stable d'*A. thaliana*

Les stratégies de clonage utilisées pour permettre l'expression des protéines pre $\beta$ -GFP et pre $\beta$ -ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur A9 sont détaillées dans l'annexe 6. Après transformation génétique, entre 30 et 70 transformants indépendants d'*A. thaliana* ont été isolés pour chaque construction (tableau 3) . Nous avons ensuite observé plusieurs transformants indépendants permettant l'expression des protéines pre $\beta$ -GFP et pre $\beta$ -ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur 35S. Sous microscope à épi-fluorescence, un signal GFP a été aisément observé chez les transformants exprimant la protéine pre $\beta$ -GFP (plus de 80 % d'entre eux). Dans différentes cellules comme les cellules épidermiques de feuilles, les trichomes et les cellules de garde des stomates, des organites fluorescents ont pu être observés (figures 48A et 48B). L'observation de fluorescence des transformants exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP a été beaucoup plus difficile. En effet, moins de 10 % des transformants ont montré une fluorescence GFP. Les organites fluorescents ont pu être observés uniquement dans les trichomes de ces plantes (figures 48C et 48D). L'altération de la morphologie mitochondriale observée semble être beaucoup plus marquée que dans les expériences d'expression transitoire dans des cellules d'épiderme d'oignon.

Afin d'observer si les morphologies mitochondriales sont identiques lors d'une expression des protéines d'intérêt dans les cellules tapétales de l'anthere, nous avons observé des anthères de plantes exprimant les protéines pre $\beta$ -GFP et pre $\beta$ -ORF138-GFP sous le contrôle du promoteur A9. L'observation des cellules tapétales des anthères a été réalisé sous microscope confocal. Nous avons ainsi pu confirmer que le promoteur permet une expression spécifique dans le tapis de l'anthere (figure 49). Les altérations de la répartition de la fluorescence observées dans les expériences d'expression transitoire ainsi que dans les trichomes d'*A. thaliana* sont aussi retrouvées dans les cellules tapétales des anthères.

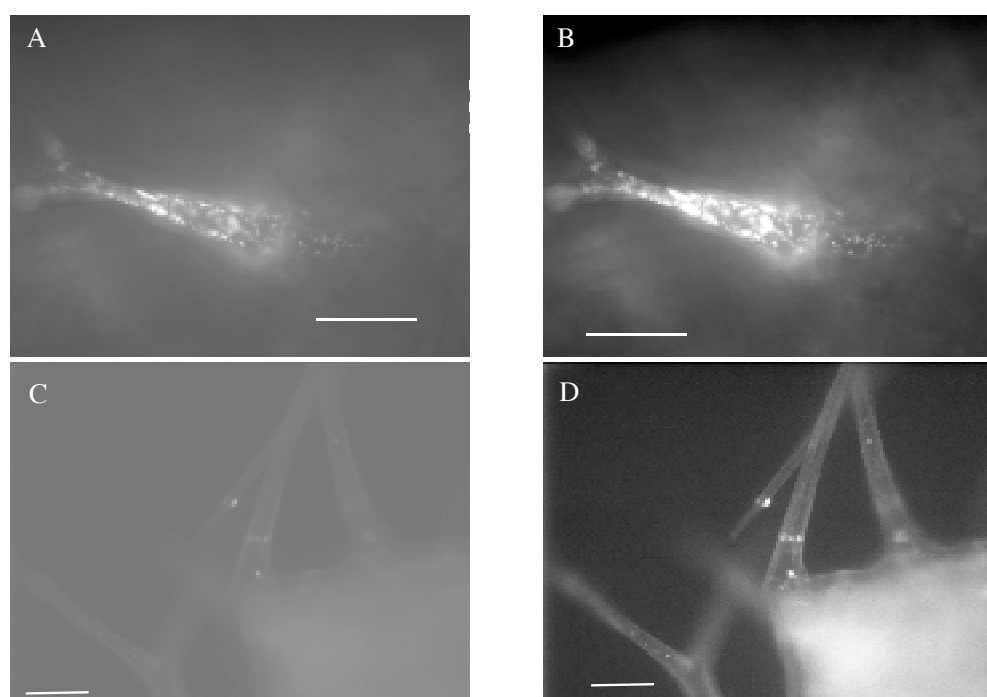
Nous disposons donc aujourd'hui d'un outil très puissant pour caractériser et comparer les morphologies mitochondriales des plantes de colza fertile et mâle stérile, dans les cellules végétatives mais aussi dans l'assise tapétale. Des expériences de transformations génétiques de plantes de colza avec ces constructions sont d'ailleurs en cours.

promoteur	gène	nombre de plantes transformées (T1)	nombre de plantes observées en fluorescence	nombre de plantes présentant un signal GFP fluorescent	nombre de plantes stériles*
35S CaMV	<i>preb-gfp</i>	29	4	4	1
	<i>preb-orf138</i>	58			1
	<i>preb-orf138-gfp</i>	164	9	3	non déterminé
A9	<i>preb-gfp</i>	26	3	3	1
	<i>preb-orf138</i>	47			0
	<i>preb-orf138-gfp</i>	67	17	2	3

\* aucune plante totalement stérile n'a été observée. Cela concerne des plantes qui présentaient des siliques significativement moins nombreuses ou de taille inférieure à la normale

### Tableau 3

Tableau indiquant le nombre de transformants obtenus et les observations réalisées pour chaque construction utilisée dans cette étude.

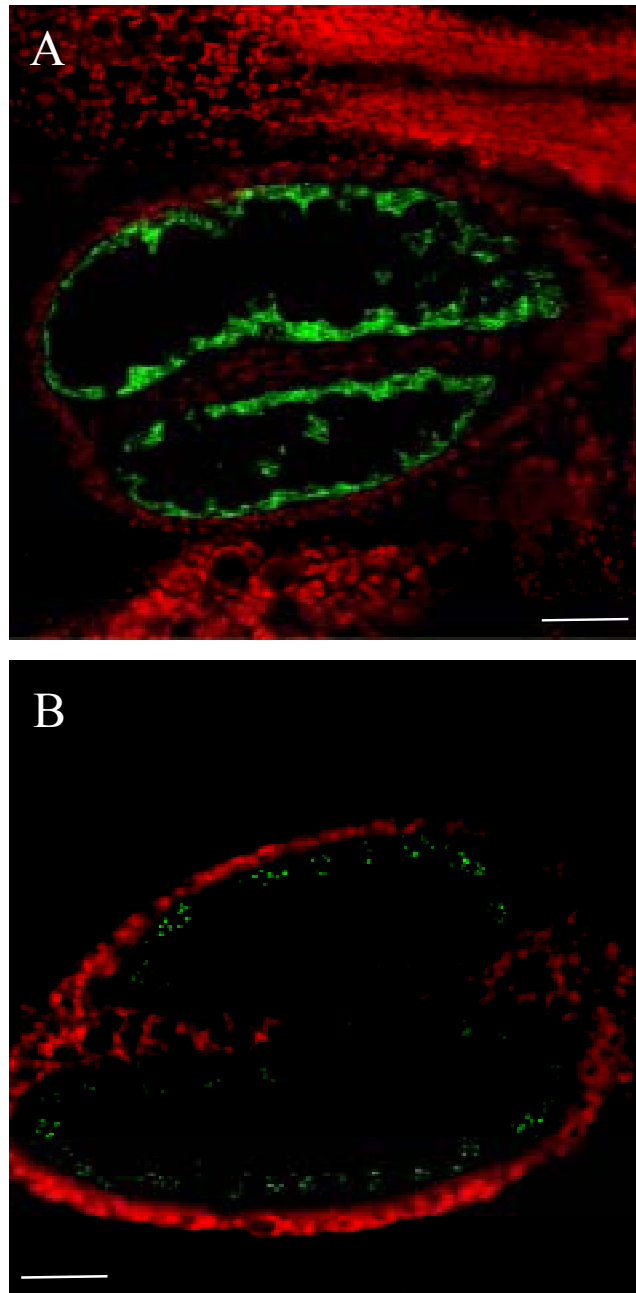


### Figure 48

Observations microscopiques de trichomes d'*A. thaliana* exprimant les protéines preb-GFP (A et B) et preb-ORF138-GFP (C et D).

Les images B et D sont issues des images A et C où le contraste a été augmenté

La barre d'échelle représente 50 µm



**Figure 49**

Observations microscopiques d'anthères d'*A. thaliana* exprimant les protéines preβ-GFP (A) et preβ-ORF138-GFP (B) sous le contrôle du promoteur A9.

Les signaux rouges correspondent à la fluorescence émise par les chloroplastes.

La barre d'échelle représente 500 μm

Nous avons pu développer des outils pour permettre l'observation des mitochondries *in vivo* dans plusieurs types cellulaires. L'utilisation de constructions permettant l'expression de l'ORF138 chez *A. thaliana* ne nous a pas permis de provoquer une stérilité mâle. Nous avons cependant observé un phénotype d'altération de la morphologie mitochondriale lors de l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138 ou de la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP dans les cellules de levure mais aussi dans les cellules de divers tissus de plantes. Ces morphologies semblent être proche de morphologies mitochondriales de mutants de levures hypersensibles à un stress oxydant (Michel Camadro, communication personnelle). De plus de nombreux auteurs ont suggéré que certaines protéines responsables de SMC perturbent les activités respiratoires (Sabar et al. 2003; Ducos et al. 2001; Hanson et al. 2004). Nous avons donc ici plusieurs faisceaux d'arguments nous suggérant une implication de l'ORF138 dans la perturbation du métabolisme mitochondrial. Or des travaux menés précédemment n'ont pas montré de différences dans les activités respiratoires entre plantes de colza fertiles et mâles stériles (Farineau et al. 1990), ni d'altération de la respiration de souches d'*E. coli* dont la croissance est inhibée par l'ORF138 (annexe 7). Nous avons donc conçu des expériences pour essayer d'observer un lien entre stress oxydatif et expression de l'ORF138 dans les cellules de levures mais aussi chez les mitochondries de colza mâle stérile.

#### **4-/ Peut-on identifier des effets de l'ORF138 sur le métabolisme mitochondrial ?**

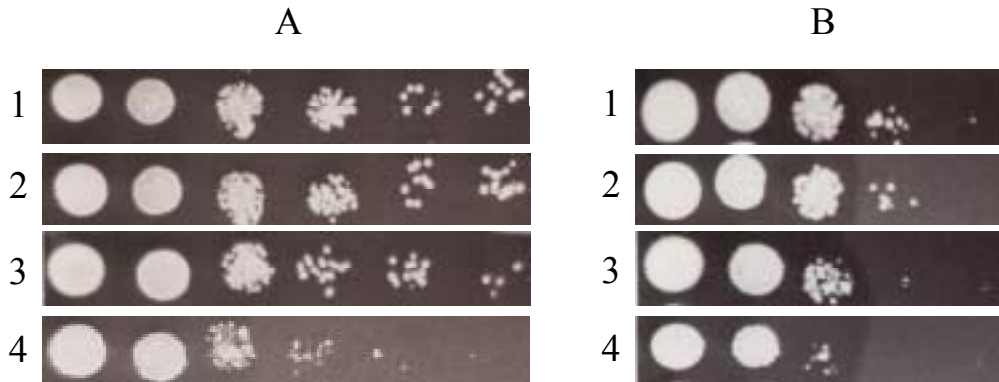
Au cours de la respiration cellulaire, la mitochondrie génère de l'ATP à travers la réduction de l'oxygène moléculaire par une série d'addition d'électrons et d'ions H<sup>+</sup> (membrane interne de la mitochondrie). Au cours du transport d'électrons il y a production de molécules de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ; OH<sup>•</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces molécules sont appelées des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS). Les ROS produites par la respiration cellulaire peuvent provoquer des oxydations des acides nucléiques et des protéines ainsi que des peroxydations des lipides. Ces altérations peuvent conduire à une mort cellulaire (revue par Hoeberichts et al. 2003).

#### 4-1/ ORF138 et stress oxydatif chez la levure

Nous avons donc testé si l'expression de l'ORF138 chez la levure *S. cerevisiae* pouvait provoquer une hypersensibilité au stress oxydatif. Les résultats antécédents (annexe 7) n'ont pas permis de révéler d'effet dû à l'expression de l'ORF138 sur la croissance des levures. Nous avons cependant testé de nouveau, mais dans des conditions différentes, l'effet de l'ORF138 sur la croissance de la levure avant de tester la sensibilité des différentes souches vis à vis d'un stress oxydatif.

Nous avons comparé le comportement des différentes souches utilisées en milieu fermentescible et non fermentescible. Des dilutions sérielles de levures ont donc été déposées sur milieu gélosé contenant soit un substrat fermentescible (glucose) soit un substrat non fermentescible (glycérol + éthanol). Après 48 heures ou 12 jours à 28°C selon les substrats, les boîtes sont observées (figure 50). Il semble que les levures exprimant l'ORF138 avec un adressage mitochondrial possèdent un léger retard de croissance en milieu fermentescible et non fermentescible (qui peut être également observé en milieu liquide). L'expression de la protéine ORF138 semble donc avoir un léger effet sur la croissance de la levure dans les conditions testées. Cet effet ne semble pourtant pas dépendre de l'activité respiratoire des cellules.

Des tests d'hypersensibilité au peroxyde d'hydrogène ont ensuite été effectués afin d'observer si les différences constatées dans des conditions standard peuvent être exacerbées. La même procédure expérimentale a été utilisée mais du peroxyde d'hydrogène a été ajouté dans le milieu gélosé afin d'induire un stress oxydant. Après 48 heures, les boîtes sont observées (figure 51). Nous pouvons ainsi remarquer que la souche exprimant l'ORF138 avec un adressage mitochondrial possède une sensibilité au stress oxydatif. Par ailleurs, la souche exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP ne présente pas de sensibilité à ce traitement. Ceci est probablement dû aux répartitions différentes des protéines pre $\beta$ -ORF138 et pre $\beta$ -ORF138-GFP au sein des membranes mitochondriales.



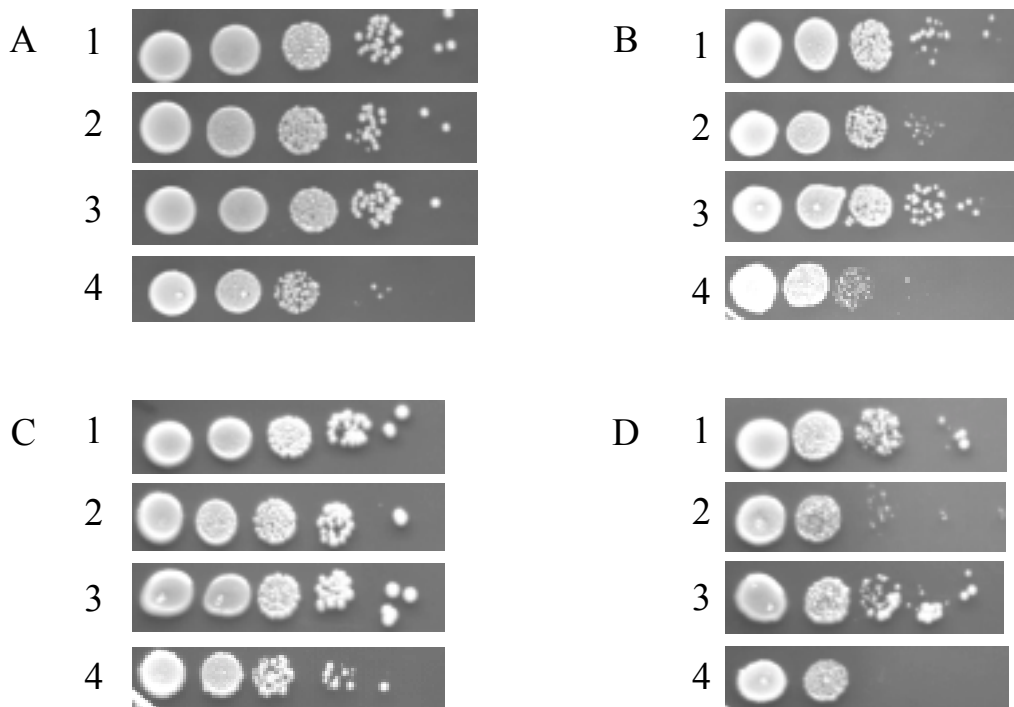
**Figure 50**

Dilutions sérielles de levures exprimant les protéines pre -GFP (2), pre -ORF138-GFP (3) et pre -ORF138 (4).

1 : levures portant le vecteur pRS426Met

A : Observations 48 h après dépôt sur glucose

B : Observations 12 jours après dépôt sur glycérol + éthanol



**Figure 51**

Dilutions sérielles de levures exprimant les protéines pre -GFP (2), pre -ORF138-GFP (3) et pre -ORF138 (4).

1 : levures portant le vecteur pRS426Met

A : Observations 48 h après dépôt sur raffinose

B : Observations 48 h après dépôt sur raffinose + 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

C : Observations 5 jours après dépôt sur raffinose

D : Observations 5 jours après dépôt sur raffinose + 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

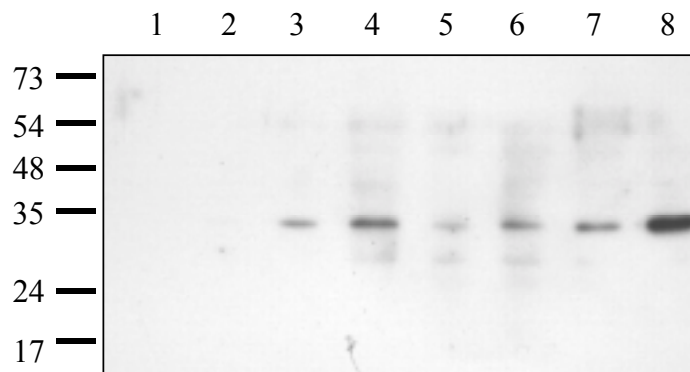
Nous avons montré que l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138 confère aux levures une hypersensibilité au stress oxydant. C'est-à-dire que dans le cas d'une augmentation du niveau de ROS, le taux de viabilité des cellules exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138 est largement diminué. Ce phénomène observé chez la levure peut-il être observé chez la plante ? Sachant que le lien entre stress oxydant et mort cellulaire programmée est maintenant bien établi, peut-on faire, par le stress oxydatif, un lien entre la présence de l'ORF138 dans les mitochondries de plantes et la mort prématurée des cellules tapétales ? Le comportement d'une enzyme de la chaîne respiratoire végétale (l'alternative oxydase AOX) qui est activée lors d'un stress oxydant peut apporter un élément de réponse.

#### 4-2/ Analyse du niveau d'expression et de l'activité AOX chez le colza

Maxwell et ses collaborateurs (Maxwell et al. 1999) ont montré que l'une des nombreuses voies induites par la génération de ROS était la voie de l'alternative oxydase (AOX). L'AOX a été révélée par l'existence d'une voie respiratoire insensible au cyanure chez les plantes, les champignons et certaines levures (revue par Sluse et al. 1998). En effet, l'inhibition de la voie du cytochrome c par les inhibiteurs du complexe III (Antimycine A) ou du complexe IV (cyanure) n'affecte pas l'activité de l'AOX. Elle transfère directement les électrons de l'ubiquinone à l'oxygène, alors réduit en eau, sans transloquer de protons vers l'espace intermembranaire (Moore et al. 1991). Elle ne participe donc pas à la mise en place du gradient de protons en court-circuitant les complexes III et IV. Elle permet ainsi une diminution de la génération de ROS par la chaîne respiratoire (Maxwell et al. 1999). Nous avons donc orienté nos travaux vers l'étude de l'accumulation de l'alternative oxydase et l'étude des activités respiratoires.

Afin de déterminer si les plantes stériles comportent un niveau d'accumulation de la protéine AOX plus important que les plantes fertiles, une révélation immunologique de cette protéine dans des extraits mitochondriaux de plantules étiolées et de boutons floraux a été effectué après électrophorèse en gel d'acrylamide. Les résultats montrent que les plantes stériles accumulent plus d'AOX que les plantes fertiles, et ce quel que soit le tissu testé (figure 52).





**Figure 52**

Détection immunologique de la protéine

Pistes 1, 2 : extraits mitochondriaux de plantules étiolées de colza fertile

Pistes 3, 4 : extraits mitochondriaux de plantules étiolées de colza mâle stérile

Pistes 5, 6 : extraits mitochondriaux de boutons floraux de colza fertile

Pistes 7, 8 : extraits mitochondriaux de boutons floraux de colza mâle stérile

Pistes 1, 3, 5 et 7 : 5 µg de protéines

Pistes 2, 4, 6, et 8 : 25 µg de protéines

Les chiffres sur la gauche indiquent les différentes tailles du marqueur en kDa

	Fertile	Stérile
NADH	346,8	829,7
NADH + KCN	9,8	27,2
NADH + KCN + nPG	0,0	0,0

**Tableau 4**

Tableau indiquant les activités respiratoires d'extraits mitochondriaux avant et après ajout de différents inhibiteurs. Les mesures sont effectuées sur le même échantillon successivement après ajout des inhibiteurs.

Les valeurs sont exprimées en fmol d'oxygène consommées par seconde et par µg de protéines

nPG : n-propyl Gallate

Ce résultat est très prometteur, mais une accumulation de la protéine n'est pas toujours corrélée strictement avec une activité accrue (McDonald et al. 2002). En effet, il est possible d'observer une différence d'accumulation de l'AOX entre différents tissus au sein d'une même plante ou alors entre deux espèces différentes sans pouvoir révéler de différences d'activité. Afin de savoir si nous pouvons corréliser cette plus forte accumulation de l'AOX dans les plantes stériles avec une activité plus importante, les activités respiratoires des mitochondries de plantes fertiles et de plantes stériles ont été comparées.

Des mesures de consommation d'oxygène par des extraits mitochondriaux issus de boutons floraux de plantes fertiles et stériles ont été effectuées. L'ajout de substrat tel que le NADH permet de mesurer la consommation d'oxygène issue du fonctionnement de la chaîne respiratoire entière (tableau 4). Ensuite l'ajout de cyanure permet l'inhibition du complexe IV entraînant ainsi l'arrêt du transfert électronique au niveau du complexe III, la consommation d'oxygène s'effectue donc uniquement par l'activité de l'alternative oxydase (tableau 4). L'ajout de n-propylgallate (inhibiteur de l'AOX) permet de vérifier qu'il n'existe pas d'activité résiduelle permettant une consommation d'oxygène. Le tableau 4 montre les différentes valeurs d'oxygène consommé par des mitochondries extraites de boutons floraux de colzas stérile et fertile avant et après ajout de différents inhibiteurs lors de deux répétitions à partir de deux préparations indépendantes. On peut constater que les mitochondries issues des plantes mâle stériles consomment plus d'oxygène que les mitochondries issues des plantes fertiles (environ 2 à 3 fois plus). Cette différence peut être observée avant et après ajout de cyanure. Ces résultats sont contradictoires avec ceux recueillis par Farineau et collaborateurs (Farineau et al. 1990). Les auteurs n'avaient pas détecté de différence de consommation d'oxygène entre des plantes mâle stériles et fertiles avant et après ajout de différents inhibiteurs. Néanmoins ces études avaient été menées sur des tissus intacts tels que les feuilles, les cotylédons et les racines. Il faut rappeler ici que le seul phénotype provoqué par la présence de l'ORF138 et observé à ce jour se situe dans les anthères. De plus nous avons effectué les mesures sur des mitochondries isolées à partir de boutons floraux et il est donc probable que nous ayons observé des phénomènes non tamponnés par l'homéostasie cellulaire.

Pour tester cette hypothèse nous avons mesuré la consommation d'oxygène par des anthères de colza fertile et mâle stérile avant et après ajout des différents inhibiteurs. Les résultats sont décrits sur le tableau 5 et montrent qu'aucune différence n'a pu être détectée. Les différences observées sur des mitochondries isolées ne sont pas observées lorsque la mesure est effectuée sur des organes entiers.

Les résultats que nous avons obtenus sont encourageants, et associés à ceux issus des études à venir sur les systèmes hétérologues actuels ou en cours de construction, serviront de base pour les travaux ultérieurs et pour l'ébauche d'hypothèses sur le mécanisme physiologique conduisant à la stérilité.

	Fertile	Stérile
NADH	109,8	124,6
NADH + KCN	28,5	43,8
NADH + KCN + nPG	0,0	0,0

**Tableau 5**

Tableau indiquant les activités respiratoires de 120 anthères de colza avant et après ajout de différents inhibiteurs. Les mesures sont effectuées sur le même échantillon successivement après ajout des inhibiteurs.

Les valeurs sont exprimées en pmol d'oxygène consommées par seconde

nPG : n-propyl Gallate

# DISCUSSION

Les objectifs du travail de thèse étaient de développer des outils moléculaires et biochimiques et de les mettre en œuvre pour obtenir des informations pertinentes sur la protéine ORF138 dans le but d'élaborer des hypothèses solides quant au mécanisme de stérilité mâle. Nous avons donc choisi d'étudier la protéine ORF138 à plusieurs échelles : séquence primaire, structures secondaires et tertiaires, localisations intracellulaires, associations moléculaires ; mais aussi d'identifier les mécanismes physiologiques potentiellement affectés par sa présence. Pour ce faire, différentes stratégies adaptées à la question posée ont été développées : expression hétérologue de l'ORF138 chez *E. coli*, expression hétérologue de l'ORF138 avec un adressage mitochondrial chez *S. cerevisiae* et *A. thaliana* et enfin des études biochimiques et physiologiques sur les lignées de colza porteuses du cytoplasme inducteur de stérilité. J'ai organisé cette discussion autour des 4 questions scientifiques qui me paraissent essentielles au moment de faire le bilan de ce travail.

### **Une approche biochimique permet-elle de réunir les éléments nécessaires à la compréhension du mécanisme ?**

La très grande majorité des résultats de l'approche biochimique a été obtenue à partir d'échantillons issus de tissus végétatifs. Le seul phénotype provoqué par l'ORF138 et détecté à ce jour est initié dans l'assise tapétale de l'anthere. Il n'était donc pas techniquement envisageable d'effectuer ces études sur de tels tissus. Néanmoins, il est, à mon sens, peu concevable que le mode d'action de la protéine ORF138 nécessite un changement de ses caractéristiques fondamentales dans l'assise tapétale. Les analyses biochimiques sur les mitochondries de colza mâle stérile nous ont permis de dégager de nombreux résultats concernant les propriétés de l'ORF138.

Nous avons montré que la protéine ORF138 est localisée dans la membrane interne mitochondriale chez le colza sous la forme d'homooligomères allant du monomère à l'hexamère, qu'elle ne comporte probablement aucun résidu exposé à l'espace intermembranaire, qu'elle est présente au sein d'un complexe protéique de masse apparente supérieure à 750 kDa et enfin qu'elle semble pouvoir se lier aux acides nucléiques mitochondriaux.

L'étude des propriétés biochimiques de l'ORF138 était nécessaire pour récolter des données sur ses caractéristiques et élaborer aujourd'hui des hypothèses quant à son mode d'action. En effet, afin de comprendre les mécanismes de la SMC Ogura, il était indispensable d'acquérir des informations sur la localisation, la biochimie et les associations moléculaires de la protéine ORF138. Ces données ont été récoltées et les résultats acquis sont de toute première importance car ils sont nouveaux. Ils seront utiles pour comprendre les mécanismes physiologiques à l'origine de la stérilité. Il est néanmoins essentiel de considérer les éléments qui nécessitent une analyse critique.

L'étude d'une protéine membranaire par une approche biochimique reste difficile. Les propriétés physicochimiques de protéines membranaires au sein d'une bicouche lipidique peuvent conduire à un comportement artéfactuel lorsqu'elles sont extraites dans un milieu hydrophile. L'observation des structures oligomériques de l'ORF138 est donc sujet à critique. C'est pourquoi nous avons testé s'il était possible de stabiliser la formation d'oligomères directement au sein de la membrane mitochondriale à l'aide de molécules réactives. La stabilisation d'oligomères par l'action de molécules comme le DMP (qui permet une liaison covalente entre deux groupements distants de 4 à 10 Å, distance équivalente à 1 ou 2 liaisons peptidiques) tend à prouver que ces formes oligomériques possèdent une réalité physiologique. D'ailleurs, il a été montré lors de travaux précédant ma thèse que les protéines ORF138, ORF138 $\Delta$ 1-43 et ORF138 $\Delta$ 58-138 possèdent la capacité de se dimériser spontanément lors d'une synthèse *in vitro* (annexe 7). Cette dimérisation, *in vitro* et *in vivo* dans tous les systèmes utilisés, constitue donc une caractéristique structurale essentielle de la protéine. Il est probable que les associations aboutissant à la formation d'homooligomères au sein des membranes mitochondriales sont dépendantes du contexte et mettent en jeu des mécanismes variés d'interaction. En effet, la détection de formes d'ordre impair (trimériques et pentamériques) par exemple suggère des interactions ne mettant pas seulement en jeu des dimères. Il existe donc probablement plusieurs types d'interactions au sein des différentes structures oligomériques.

En ce qui concerne le complexe protéique de masse apparente supérieure à 750 kDa détecté dans des extraits mitochondriaux de tissus végétatifs et reproducteurs, nous ne pouvons pas exclure, à mon sens, qu'il soit le résultat d'interactions non physiologiques entre plusieurs oligomères. Les tentatives d'identification de partenaire(s) protéique(s) au sein de ce complexe de haut poids moléculaire n'ont pas été fructueuses et la présence de contaminations (peroxysomales en particulier) a été détectée. Les échantillons utilisés lors de ces expériences ne sont donc pas d'une pureté suffisante. L'absence de détection de protéines mitochondriales suggère alors que le complexe contenant l'ORF138 est aussi peu abondant que les complexes protéiques contaminants. La préparation d'échantillons mitochondriaux présentant une pureté largement supérieure me semble donc indispensable dans ce cas précis. La pureté est cependant inversement proportionnelle à la quantité de mitochondries préparée et vu les quantités nécessaires pour ces expériences, cela s'avère techniquement difficile. Malgré ces difficultés, l'amélioration de la technique d'isolement utilisée au laboratoire est indispensable si la recherche de partenaire(s) protéique(s) est entreprise. Les différents échanges avec Michel Neuburger m'ont amené à considérer que l'utilisation d'un gradient de saccharose consécutif au gradient de Percoll permettrait d'éliminer substantiellement les contaminants et permettrait l'obtention de fractions mitochondriales de pureté bien supérieure.

Nous pouvons également émettre une autre hypothèse quant à l'absence de détection de protéines mitochondriales dans les extraits contenant le complexe de l'ORF138. En effet, les résultats obtenus seraient identiques si les partenaires de l'ORF138 possèdent tous un profil de digestion trypsique incompatible avec leur identification. Même si cette situation est, à mon avis, peu envisageable, nous ne pouvons cependant pas l'exclure.

L'absence d'identification de partenaires protéiques au sein du complexe de haut poids moléculaire suggère que ce dernier ne comporte peut être qu'une seule protéine : l'ORF138. La localisation de la protéine dans la membrane interne mitochondriale ainsi que la nature de ses résidus C terminaux nous ont encouragés à tester la capacité de l'ORF138 à se lier aux acides nucléiques. Les résultats obtenus par l'approche choisie sont prometteurs, mais ne constituent pas une preuve univoque de cette liaison. La co-immunoprécipitation de l'ORF138 avec son partenaire nucléique constituera la preuve ultime de la liaison.

Malgré les difficultés expérimentales et l'incertitude sur la signification de certains résultats, ces travaux sur la protéine ORF138 *in planta* constituent, à ma connaissance, une des premières études biochimiques aussi abouties sur une protéine responsable d'une stérilité mâle cytoplasmique dans son contexte naturel. Cette approche est relativement laborieuse et met en jeu des techniques qu'il faut la plupart du temps optimiser. De plus les quantités de matériel requises nous empêchent d'effectuer ces travaux sur les tissus où le phénotype induit se manifeste. Il n'est pas non plus envisageable de tester des modifications de l'ORF138 dans ce système. Si nous voulons disposer d'une approche permettant de relier une caractéristique de la séquence primaire avec une caractéristique structurale, il est nécessaire de se placer dans un système hétérologue. Ce constat a été effectué bien avant l'obtention de ces résultats et la mise en œuvre, avant mon arrivée au laboratoire, de systèmes d'expression hétérologues permettant de récolter de nombreuses informations facilement et rapidement, m'a permis d'explorer ces voies.

C'est ainsi que la protéine ORF138 a été exprimée chez la bactérie et chez la levure, fusionnée dans ce cas à une préséquence d'adressage mitochondrial. J'ai ainsi pu constater que, dans tous les systèmes étudiés, la protéine ORF138 est très fortement associée aux membranes. Elle a été caractérisée comme étant intrinsèque aux membranes cytoplasmiques de la bactérie *E. coli* et aux membranes mitochondriales de levure.

Les résultats obtenus en systèmes hétérologues ainsi qu'à partir des mitochondries de colza nous permettent de dégager des caractéristiques de l'ORF138 dans tous les systèmes étudiés. L'ORF138 est une protéine qui possède la capacité de :

- 1 - s'associer très fortement aux membranes
- 2 - former des structures dimériques

Ces caractéristiques sont également retrouvées chez quelques autres protéines de SMC. Il a été montré notamment que les protéines T-URF13 et ORF239 responsables de la SMC Texas chez le maïs et de la SMC *pvs* chez le haricot sont associées aux membranes internes mitochondriales (Rhoads et al. 1995; Sarria et al. 1998). La protéine ORFH522 responsable de la SMC PET1 chez le tournesol est également une protéine intrinsèque aux membranes mitochondriales (Horn et al. 1996). Il semble également que la dimérisation est une caractéristique commune à plusieurs protéines de SMC. L'exemple le plus proche des résultats présentés dans cette thèse est celui de la protéine T-URF13 qui forme également des structures tétramériques aboutissant à un pore membranaire (Korth et al. 1991; Kaspi et al. 1993; Rhoads et al. 1994; Rhoads et al. 1998).



La protéine ORF239 forme également des structures dimériques au sein des membranes mitochondriales (Sarria et al. 1998). Enfin, il est à noter que la protéine ORF125 (variant de l'ORF138 et responsable de la SMC dite kosena) peut également être détectée sous forme de dimères et de trimères indiquant que les 13 résidus absents chez l'ORF125 (KKEGKGEIEGKEE) ne sont probablement pas impliqués dans l'association oligomérique de l'ORF138 (Iwabuchi et al. 1999).

L'utilisation du système hétérologue procaryote est dans notre cas très intéressant car la bactérie peut "mimer" la situation mitochondriale. De plus, la localisation de l'ORF138 chez la bactérie va nous permettre de confirmer la topologie à la membrane interne mitochondriale en testant la topologie de l'ORF138 dans les membranes cytoplasmiques bactériennes par des fusions traductionnelles. Cet outil nous permet également de tester des variants de l'ORF138 et de mettre en place les relations existant entre la séquence primaire et les caractéristiques structurales de la protéine.

### **L'analyse de la séquence peut-elle donner des informations sur les caractéristiques structurales de l'ORF138 déterminantes pour son action ?**

Des travaux précédant ma thèse ont permis d'observer que l'expression de l'ORF138 provoque une inhibition de croissance de la bactérie (annexe 7). Ce phénotype nous a permis d'entreprendre et de tester l'effet de modifications aléatoires sur la séquence primaire de la protéine. Afin de déterminer les acides aminés ou les domaines protéiques indispensables à l'action de l'ORF138 chez la bactérie, une collection de formes mutées de l'ORF138 a été construite. Le crible réalisé à partir de cette banque nous a permis d'isoler des formes de l'ORF138 ne provoquant plus l'inhibition de la croissance chez la bactérie. Toutes les formes identifiées présentent un codon stop à une position allant du codon 3 au codon 42. Ces codons stop précoces ne permettent pas la production d'une protéine entière et les signaux détectés par les anticorps anti-ORF138 et anti-GFP ne peuvent être expliqués que par une reprise de la traduction du gène au niveau des codons méthionine présents dans la séquence ou générés par la mutagenèse. Il semble donc que la dissociation des domaines hydrophobes et hydrophiles soit, dans les conditions testées, le seul moyen pour abolir l'effet délétère de l'ORF138 chez la bactérie.

Ainsi la mutation ponctuelle de plusieurs acides aminés sans dissociation des domaines n'a pas permis l'isolement de clone ayant perdu l'effet inhibiteur. Cela veut donc dire que la séparation des domaines protéiques entraîne la perte d'une interaction potentielle entre résidus présents dans chaque domaine. Afin de déterminer la nature de ces résidus il serait possible d'effectuer une mutagenèse dirigée sur les codons méthionines de l'ORF138 et d'effectuer une nouvelle PCR en conditions mutagènes puis réaliser un nouveau crible. Nous avons pu montrer que quelques mutations ponctuelles ne suffisent pas à altérer l'effet provoqué par l'ORF138 sur la croissance bactérienne, il est donc fort probable que les formes isolées lors de ce nouveau crible seraient similaires à celles isolées à ce jour. Ces résultats démontrent bien que l'interaction moléculaire entre les domaines hydrophile et hydrophobe sont indispensables au maintien d'une protéine ORF138 "efficace".

Bien que ne nous l'ayons pas démontré formellement, nous pouvons penser que les protéines tronquées issues de la mutagenèse sont solubles. Elles sont en effet constituées essentiellement du domaine hydrophile (ORF138 $\Delta$ 1-43, voir annexe 7), majoritairement soluble, en fusion avec la GFP. On peut remarquer que l'association aux membranes, qui semble être une caractéristique commune de plusieurs protéines de SMC, est également essentielle pour l'effet produit par l'ORF138 sur la croissance bactérienne.

Il n'existe pas d'indice, aujourd'hui, permettant de savoir s'il existe un mécanisme commun aux différents systèmes de SMC conduisant à la stérilité mâle ou bien si un mécanisme unique impose des contraintes structurales aux protéines de SMC. L'absence de similitude entre protéines de SMC, à part dans de rares cas, ne permet pas l'identification de propriétés structurales conservées. Néanmoins, la recherche de motif(s) commun(s) entre l'ORF138 et d'autres protéines de stérilité mâle cytoplasmique nous a permis d'identifier un domaine de 15 acides aminés appelé  $\pi$  dont les arrangements entre acides aminés hydrophiles et acides aminés hydrophobes est conservé entre l'ORF138, l'ORF107 de sorgho et l'ORF79 de riz. La suppression de ce domaine ne permet pas l'abolition de l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne, mais réduit quand même cet effet. On peut alors se demander si l'effet de la suppression de ce domaine est dû à la suppression de l'interaction mise en jeu par les résidus qu'il contient ou seulement au raccourcissement de la chaîne à cette position. La comparaison des effets provoqués par la protéine ORF138 $\Delta$ 62-76 où le domaine  $\pi$  est supprimé avec ceux provoqués par une protéine ORF138 où il est modifié, nous permettra de déterminer si l'importance de ce domaine est dû à sa nature ou dû à la distance qu'il génère entre les domaines hydrophobe et hydrophile.

Les premières expériences de troncatures (annexe 7) ont montré une interaction potentielle entre le domaine hydrophobe (résidus 1 à 58) et le domaine hydrophile (résidus 43 à 138). Le domaine  $\pi$  mis en évidence dans ce travail est inclus dans ce dernier, qui comporte en outre 3 répétitions du motif KGEIEGKEEKKEG dans sa partie C-terminale. Les courbes de croissance réalisées sur des souches exprimant des protéines tronquées ont montré que la protéine ORF138 $\Delta$ 58-138 affecte moins la croissance bactérienne que les protéines ORF138 $\Delta$ 76-138 et ORF138 $\Delta$ 62-76. Le domaine protéique constitué des résidus 76 à 138 semble être une des entités responsables de l'action de la protéine chez la bactérie. Pour résumer, les deux parties du domaine hydrophile sont nécessaires à l'interaction potentielle entre les domaines identifiés par troncature, ces interactions peuvent être intra ou interchaîne et peuvent déterminer la bonne conformation de la protéine. Cette donnée est essentielle car c'est la première fois, à ma connaissance, qu'un lien entre plusieurs protéines de SMC non apparentées a pu être effectué. Les données acquises sur ce domaine de 15 acides aminés peuvent nous permettre de faire le lien entre le système bactérien et le mécanisme de SCM *in planta*. De plus, si son importance est démontrée et si elle est partagée par des protéines de SMC non apparentées, il sera alors possible d'anticiper que les protéines en question induisent la stérilité par un mécanisme commun.

### **L'adressage de l'ORF138 vers les mitochondries à partir du cytoplasme peut-il être utilisé pour obtenir des indices quant à l'effet provoqué par sa présence ?**

Afin de développer un système eucaryote dans lequel nous pourrions effectuer un lien entre les caractéristiques structurales de l'ORF138 et les effets qu'elle provoque, nous avons choisi d'exprimer la protéine, fusionnée à une séquence d'adressage aux mitochondries, chez la levure *S. cerevisiae*. Nous avons ainsi pu déterminer que, dans les mitochondries de levure, la protéine semble répartie entre les membranes externes et les membranes internes. Il faut rappeler que chez le colza, où elle est associée aux membranes internes des mitochondries, la protéine ORF138 est codée par un gène mitochondrial et traduite dans la matrice ; alors que dans nos expériences utilisant la levure, elle est importée *in vivo* dans les mitochondries après traduction dans le cytosol.

Il est donc apparu très clairement que la protéine ORF138 n'intègre pas les membranes mitochondriales de façon identique si elle est produite dans la matrice où importée par la mitochondrie.

Cette répartition est différente pour la protéine de fusion ORF138-GFP. Nous avons montré qu'elle est exclusivement (ou presque) présente dans les extraits de membrane externe mitochondriale. Des observations cytologiques effectuées sur les levures exprimant la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP nous ont permis de détecter des amas de fluorescence suggérant une agrégation des mitochondries. Il est à noter que la protéine ORF138 peut former des oligomères dans la membrane mitochondriale de colza. Si la protéine ORF138-GFP garde cette capacité à former des homooligomères, les figures de fluorescence très localisées observées dans ce cas peuvent être interprétées de différentes façons. La fluorescence détectée dans les levures exprimant l'ORF138-GFP peut ne pas se superposer au réseau mitochondrial et les ponctuations observées sont générées par l'oligomérisation de la protéine de fusion. Nous ne pouvons pas exclure cependant que le réseau mitochondrial soit altéré et que l'équilibre dynamique entre fusion et fission soit déplacé vers une agrégation due à l'oligomérisation de protéines situées sur deux membranes externes mitochondriales adjacentes. Cette hypothèse est renforcée par les expressions transitoires dans les cellules d'épiderme d'oignon où la coexpression des protéines ORF138 et GFP dans ces cellules provoque une morphologie mitochondriale intermédiaire entre celle observée à l'aide de la GFP et celle provoquée par l'expression de la protéine ORF13-GFP. Ces observations sont alors cohérentes si on postule que les localisations submitochondriales des protéines adressées sont conservées entre levure et plantes (parce que les mécanismes d'import sont très proches). Les modifications de répartition de la fluorescence GFP seraient essentiellement causées par les molécules d'ORF138 (ou d'ORF138-GFP) localisées dans la membrane externe des mitochondries. Dans tous les cas, il est peu probable que ces morphologies mitochondriales "aberrantes" soient présentes chez le colza stérile au vu des localisations submitochondriales. La stratégie d'adressage employée est alors *a posteriori* contestable. Néanmoins, le phénomène engendré par la protéine de fusion peut être utilisé pour analyser les régions de la séquence qui provoquent l'agrégation.

Une approche similaire à celle qui a été menée chez la bactérie peut donc être envisagée. En effet, des protéines ORF138 modifiées pourront être exprimées en fusion avec la GFP afin de tester si elles provoquent toujours des figures de fluorescence ponctuelles. Nous pourrions également tester l'effet des protéines modifiées préalablement identifiées dans le système bactérien afin de relier éventuellement le phénomène d'inhibition de la croissance chez *E. coli* à celui d'agrégation d'organites lors d'une fusion avec la GFP chez la levure.

L'utilisation de systèmes plus proches du colza génétiquement, biochimiquement et physiologiquement, est indispensable à l'étude du mécanisme de SMC. C'est dans ce but que nous avons tenté de mimer la stérilité mâle par transgénése chez *Arabidopsis thaliana*. Le but de ce travail est de pouvoir tester des variants de l'ORF138 *in planta*, malheureusement la transformation mitochondriale n'étant pas à ce jour disponible, nous avons mené des transformations nucléaires. Seuls deux exemples de stérilités mâles produites par transformation nucléaire et expression de protéines mitochondriales potentiellement impliquées dans des SMC ont été publiés à ce jour :

1- L'expression chez le tabac de l'ORF239, responsable d'une SMC chez le haricot, permet de provoquer une stérilité mâle (He et al. 1996). Cependant la protéine ORF239 est loin d'être représentative des protéines de SMC. En effet, la protéine ORF239 est exportée hors des mitochondries et retrouvée dans les dépôts de callose des microspores (Abad et al. 1995). La localisation extramitochondriale et même extracellulaire de la protéine est une caractéristique qui a permis aux auteurs de provoquer une stérilité mâle à la fois en exprimant l'ORF239 avec et sans préséquence d'adressage mitochondrial. La situation est bien évidemment très différente du système que nous étudions.

2- L'expression d'une protéine ATP9 de blé, fusionnée à une préséquence d'adressage mitochondriale et codée par la séquence non éditée du transcrit mitochondrial correspondant, a permis l'obtention de plantes de tabac mâle stériles (Hernould et al. 1993; Hernould et al. 1998). Cependant, la relation entre *atp9* non éditée et une stérilité cytoplasmique chez le blé n'a pas été formellement démontrée. Cet exemple est néanmoins intéressant dans notre cas car il implique des mécanismes qui peuvent être apparentés à ceux d'une SMC.

Nous pouvons citer un troisième exemple où la protéine T-URF13, responsable de la SMC Texas du maïs, permet de provoquer une sensibilité au méthomyl (tout comme dans les lignées mâle stériles) lorsqu'elle est adressée aux mitochondries de tabac (Chaumont et al. 1995). Cette sensibilité ne s'accompagne cependant pas d'une stérilité mâle. Aucun travail n'a été aujourd'hui publié pour expliquer cette absence de stérilité mâle. Par contre, dans de très nombreux cas, bien que rarement publiés (Wintz et al. 1995), beaucoup de tentatives se sont révélées infructueuses.

Des travaux de transformations nucléaires de tabac et d'*A. thaliana* avec des constructions permettant l'expression de la protéine ORF138 fusionnée à une préséquence mitochondriale sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV ou sous le contrôle du promoteur TA29 (spécifique du tapis) ont été menés avant mon arrivée au laboratoire. Ces expériences n'ont pas permis l'observation de plantes mâle stériles (Grelon 1995 et résultats non publiés). Cependant, il a été montré que les transcrits correspondant à l'*orf138* n'ont pas pu être détectés dans les tabacs transgéniques quel que soit le promoteur. Afin de permettre une expression optimisée, le gène *orf138* a donc été recodé pour augmenter le pourcentage en bases GC et supprimer une séquence de polyadénylation prédite (annexe 7). De nouvelles transformations génétiques d'*A. thaliana* ont été effectuées permettant l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138, à partir du gène recodé, sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Les nombreuses tentatives, effectuées lors de cette thèse, pour détecter la protéine dans des extraits de tissus végétatifs ont toutes été infructueuses alors que le transcrit correspondant à l'*orf138* a été détecté dans la quasi totalité des lignées testées. Deux hypothèses peuvent être émises. La première est qu'une dégradation post traductionnelle de l'ORF138 a lieu dans le cytosol d'*A. thaliana*. Dans ce cas, le processus de la dégradation ainsi que ses acteurs peuvent être intéressants dans une approche plus globale de la régulation de l'expression de gènes dont les produits sont adressés à la mitochondrie. La deuxième est qu'il existe des modifications post traductionnelles au niveau des épitopes de l'ORF138 ne permettant pas la reconnaissance de la protéine par les anticorps disponibles au laboratoire. Cette hypothèse est, d'après moi, la plus probable car les mêmes difficultés ont été rencontrées lors de l'expression de la protéine de fusion ORF138-GFP quel que soit le tissu testé. En effet, malgré les observations cytologiques permettant de confirmer la présence de la protéine, elle n'a jamais pu être détectée par le sérum dirigé contre la protéine ORF138.

Toutefois, le nombre de cellules où la fluorescence peut être observée est très faible. De plus, nous avons pu, grâce à la construction permettant l'expression de la protéine GFP fusionnée à une préséquence mitochondriale, confirmer que le promoteur 35S du CaMV est très peu actif dans les cellules tapétales de l'anthère. Il est donc difficile de conclure si l'absence de plantes mâle stériles est due à l'absence de protéine ORF138 dans le bon type cellulaire au bon moment, ou aux modifications qu'elle peut subir après traduction, ou encore à l'absence de partenaires ou d'interactions adéquats chez *A. thaliana*.

Nous avons donc entrepris le clonage du promoteur A9 d'*A. thaliana* qui est déjà bien caractérisé et très actif dans le tapis des anthères (Paul et al. 1992). Les observations de contrôle que nous avons réalisées sur des plantes exprimant la protéine pre $\beta$ -GFP nous ont permis de constater que l'activité du promoteur était détectée dans le tapis pendant la méiose des cellules sporogènes, ce qui est conforme à ce qui était préalablement décrit (Paul et al. 1992). L'expression de l'ORF138 fusionnée à une préséquence mitochondriale sous le contrôle du promoteur A9 ne nous a cependant pas permis d'obtenir des plantes mâle stériles. Il est à noter que, de nouveau, nous n'avons pas pu détecter la protéine dans les tissus de boutons floraux. Ceci nous conduit à émettre des réserves identiques à celles évoquées auparavant sur l'absence de stérilité mâle. De plus, nous savons à présent que lorsque cette protéine est exprimée puis adressée aux mitochondries à partir du cytosol chez la levure, seulement une partie est localisée dans la membrane interne mitochondriale. Comme les mécanismes d'importation entre levure et plantes sont très analogues, il est probable que cette répartition de la protéine importée dans les membranes interne et externe de la mitochondrie soit conservée chez les plantes transformées d'*A. thaliana*. Cette localisation est différente de celle observée chez le colza mâle stérile et l'on peut penser que l'absence de stérilité mâle dans les plantes transgéniques est causée par cette différence de localisation ou bien par une conformation et une topologie membranaire modifiées par l'adressage de la protéine à partir du cytosol. Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré qu'il existe un effet seuil de la quantité de copies du gène *orf138* en-dessous duquel le phénotype mâle stérile n'apparaît plus (Bellaoui et al. 1998). Il existe donc probablement un effet dose de la quantité de protéines comportant un seuil au-dessus duquel les microspores avortent et en dessous duquel aucun phénotype ne se manifeste. Il est donc possible que ce seuil ne soit pas atteint dans les cellules tapétales des plantes transgéniques quel que soit le promoteur ce qui expliquerait en partie ou en totalité l'absence de stérilité mâle chez ces plantes.

Cette incapacité à produire des plantes mâle stériles par transformation nucléaire peut être considérée comme un point commun entre de nombreuses protéines de SMC. Même si aucun élément n'indique aujourd'hui qu'il existe un mécanisme d'action commun à toutes ou certaines protéines de SMC, l'action de ces protéines est, à mon avis, probablement inféodée à des modifications ou des interactions nécessitant qu'elles soient traduites dans la matrice mitochondriale.

D'ailleurs, il n'existe que très peu d'exemples de mutants mitochondriaux complémentés par une expression nucléaire du gène natif. C'est le cas de VAR1 (protéine de la petite sous unité du ribosome mitochondrial) chez la levure *S. cerevisiae* (Sanchirico et al. 1995; Sanchirico et al. 1998) et du gène *urf a* qui est responsable d'un phénotype "mutator" mitochondrial chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* et qui est probablement une protéine ribosomique (Neu et al. 1998). Ces deux exemples ne mettent pas en jeu des protéines membranaires dont la topologie à la membrane et la conformation sont primordiales mais des protéines solubles qui sont moins sujettes aux différences engendrées par un adressage. C'est probablement pourquoi aucun exemple avec des protéines membranaires n'a été publié jusqu'à aujourd'hui même chez la levure où de nombreux mutants mitochondriaux sont disponibles.

Aucune des approches menées jusqu'à ce jour n'a permis de mimer la stérilité mâle par transformation nucléaire. Cette absence de plantes transformées mâle stériles est probablement dû à un effet seuil et à une localisation submitochondriale inadaptée liée à l'adressage de la protéine à partir du cytosol. Dans notre recherche des mécanismes physiologiques induits par la présence de l'ORF138, il est nécessaire de travailler directement sur le colza mâle stérile, malgré les difficultés, mais aussi sur les systèmes hétérologues, même s'ils sont imparfaits.



## **Peut-on identifier des effets physiologiques de l'ORF138 dans les systèmes d'études disponibles ?**

De nombreuses observations sur la dégénérescence des cellules tapétales lors du développement normal de l'anthère ont permis de penser que la disparition de cette assise est due à un programme de mort cellulaire. En effet, il a été montré que durant le développement des grains de pollen, peu après la formation des tétrades mais avant la mitose pollinique, les cellules tapétales dégèrent. Cette dégénérescence est précédée de la rupture partielle des parois cellulaires, de la polarisation du cytoplasme, d'une vacuolisation importante et enfin d'une rupture complète des cellules. Ces caractéristiques histologiques proches des événements observés chez les animaux lors de la mort cellulaire programmée suggèrent qu'il s'agit d'une mort cellulaire programmée végétale. Seuls les travaux sur le tournesol ont permis de mettre en évidence au niveau moléculaire des événements probablement liés à un programme de mort cellulaire (Balk et al. 2001). En effet, les auteurs ont pu détecter un relargage du cytochrome c dans le cytoplasme ainsi qu'un clivage oligonucléosomal de l'ADN.

L'expression de RNase dans le tapis a été utilisée pour générer des stérilités mâles artificielles par une dégénérescence prématurée de l'assise tapétale (Paul et al. 1992; Denis et al. 1993). Des stratégies antisens, spécifiques du tapis, ciblant des gènes dont le produit est adressé à la mitochondrie ont également permis de provoquer des stérilités mâles. C'est le cas des constructions antisens de l'AOX (Kitashiba et al. 1999) et de la sous unité E1 $\alpha$  de la pyruvate deshydrogénase (Yui et al. 2003). Ces expériences montrent que l'altération des fonctions mitochondriales dans le tapis peut conduire à une stérilité mâle par la dégénérescence prématurée de cette assise. En ce qui concerne les SMC, le seul cas où la mort prématurée des cellules tapétales a pu être reliée à un programme de mort cellulaire est la SMC PET1 chez le tournesol. Les auteurs ont pu montrer qu'il y avait un relargage anticipé du cytochrome c dans le cytosol ainsi qu'un clivage oligonucléosomal de l'ADN juste avant la dégénérescence prématurée du tapis (Balk et al. 2001).

Il est intéressant de noter que l'observation, en cytologie, de la morphologie mitochondriale permet de discriminer un processus de mort cellulaire programmée d'autres processus (Jacobson et al. 1997). En effet, lors de la MCP les mitochondries sont conservées jusqu'à l'apparition des caractères histologiques spécifiques de ce phénomène. L'utilisation de la construction permettant l'expression de la protéine pre $\beta$ -GFP sous le contrôle du promoteur A9 est désormais envisageable pour déterminer la morphologie mitochondriale et suivre les modifications éventuelles dans les cellules tapétales de colza avant et pendant leur dégénérescence. Cela constituera un outil très puissant pour la description et la compréhension du mécanisme conduisant à la disparition du tapis dans les plantes fertiles et mâle stériles. D'ailleurs les transformations génétiques de colzas fertiles et mâle stériles avec cette construction sont en cours. Néanmoins, il faudra également effectuer des observations plus poussées et donc plus précises sur les modifications intracellulaires subies par cette assise avant sa disparition. C'est pourquoi, une collaboration avec une équipe de Madrid (Mercedes Lucas, Centro de Ciencias Medioambientales) a été engagée afin d'étudier ces modifications par microscopie électronique dans les cellules tapétales de colzas fertiles et mâle stériles. Ces études ainsi que l'utilisation de marqueurs spécifiques de MCP nous permettront de décrire le processus de la disparition du tapis, d'en identifier la nature (MCP ou un autre phénomène) et de déterminer si ces mécanismes sont similaires entre les plantes fertiles et les plantes mâle stériles.

Les plantes transgéniques exprimant, dans le tapis, une ORF138 adressée aux mitochondries ne présentent pas de stérilité mâle. Cette absence de stérilité mâle est probablement au moins en partie expliquée par la localisation submitochondriale de la protéine, identifiée chez la levure et qui est supposée être la même chez *A. thaliana*. Nous pouvons rappeler que les morphologies mitochondriales observées lors de l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138-GFP dans les cellules de levure et de plante sont similaires. Ceci conforte donc l'idée qu'il existe de nombreuses similitudes dans le comportement de l'ORF138 dans des mitochondries de levure et de plante.

Il serait particulièrement précieux de disposer d'un système facilement manipulable dans lequel ce comportement serait le plus proche possible de celui de l'ORF138 dans le colza mâle stérile. Il est donc envisagé d'effectuer une transformation du génome mitochondrial de levure afin que la protéine soit produite au sein de la matrice comme c'est le cas chez le colza. Les souches ainsi générées pourront ainsi être des outils formidables pour tester les effets associés à l'expression de protéines ORF138 modifiées et relier ainsi les caractéristiques structurales et la fonction de l'ORF138. Le code génétique du génome mitochondrial de levure étant différent de celui des mitochondries de plantes, il est nécessaire de recoder le gène *orf138* (ce qui représente une différence de 75 nucléotides répartis sur 66 codons). Si un effet physiologique lié à l'expression de l'ORF138 est alors détecté dans ces souches, ce système nous permettra de tester l'effet des protéines modifiées. Il sera alors possible de déterminer la nature des caractéristiques structurales qui influencent l'action de la protéine. L'identification de modifications physiologiques engendrées par la protéine ORF138 est indispensable à la compréhension du mécanisme et sera probablement facilitée par la transformation génétique des mitochondries de levure et par les analyses physiologiques qui seront alors effectuées.

Néanmoins, certains travaux menés lors de cette thèse nous apportent des données encourageantes, malgré l'imperfection des systèmes étudiés. En effet, lors de l'expression de la protéine pre $\beta$ -ORF138 chez la levure, nous avons pu observer un ralentissement de la croissance par rapport aux souches témoins. La localisation submitochondriale de la protéine a montré que celle-ci est insérée pour partie dans la membrane interne et pour partie dans la membrane externe. L'effet provoqué par la protéine ORF138 sur la croissance des levures alors que seule une certaine proportion est insérée dans la membrane interne semble bien confirmer que la levure peut être utilisée comme organisme modèle pour étudier un effet physiologique de la protéine ORF138.

De plus, nous avons pu détecter un effet physiologique de l'ORF138. Nous avons montré que les levures exprimant l'ORF138 manifestent une hypersensibilité à un stress oxydatif dans certaines conditions. Parallèlement, le contenu en alternative oxydase des mitochondries de tissus végétatifs et reproducteurs de colzas fertiles et stériles a été étudié. Nous avons pu prouver qu'il existe une accumulation plus importante d'AOX dans les mitochondries de colza stérile dans les deux types de tissus. Les résultats acquis dans ces deux systèmes nous laissent penser que l'ORF138 pourrait engendrer directement ou indirectement une augmentation de la quantité d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Cette augmentation rendrait les levures hypersensibles à un stress oxydant et provoquerait chez les plantes l'activation de l'AOX en réponse à ce stress. Les résultats préliminaires de mesure des activités respiratoires sensibles et insensibles au cyanure dans les mitochondries de boutons de colzas stériles et fertiles semblent être encourageants puisqu'on détecte une activité AOX plus intense dans les mitochondries de boutons de colzas mâle stériles. Il est cependant nécessaire de rester prudent sur les résultats de ces expériences préliminaires. Les contaminations différentes en thylakoïdes, dans les échantillons préparés, peuvent moduler grandement les valeurs de consommation d'oxygène calculées. En effet, les valeurs observées sont standardisées en utilisant la quantité de protéines utilisée pour la mesure. L'amélioration de la pureté des préparations mitochondriales nous permettra d'obtenir des résultats plus rigoureux.

Des travaux antécédents, lors de la mesure de respiration d'explants foliaires et de cotylédons, n'ont pas pu révéler de différences entre plantes fertiles et mâle stériles (Farineau et al. 1990). Nous avons testé si des différences pouvaient être observées lorsque les mesures étaient faites sur les tissus reproducteurs. Les mesures de respiration effectuées sur des anthères entières n'ont pas permis non plus de détecter de différence. Dans ce cas, la part de la respiration de l'assise tapétale dans la respiration totale de l'organe est très difficile à estimer. L'homéostasie générale de la cellule mais aussi de l'organe peuvent également contribuer à réguler des phénomènes qui ne pourraient alors être observés qu'à partir de mitochondries isolées.

Il n'existe que peu d'exemples impliquant une modulation des activités respiratoires associée à une SMC. Nous pouvons citer la SMC PET1 du tournesol où les auteurs ont montré une diminution de l'activité F1-F0 ATP synthase dans les plantes stériles (Sabar et al. 2003).

D'après leur modèle, la protéine ORFH522 qui est responsable de la SMC et qui possède 18 résidus N-terminaux présentant des homologies avec la protéine ORFB (orthologue de la protéine ATP8) interférerait avec l'activité ATP synthase et provoquerait une mort cellulaire programmée prématurée dans l'assise tapétale car la forte demande en énergie de ce tissu ne pourrait être satisfaite. Le deuxième cas de modulation des activités respiratoires concerne la SMC *G* chez la betterave (Ducos et al. 2001). Chez les individus mâle stériles, il a été détecté la présence de sous-unités aberrantes des complexes I et IV accompagnée d'une diminution de l'activité du complexe IV. Cette diminution serait compensée par la surexpression de l'AOX. Nous pouvons également citer les mutants CMSI et CMSII de *Nicotiana sylvestris* qui présentent une altération de l'activité du complexe I et qui sont partiellement mâle stériles (Gutierrez et al. 1997). Ces plantes présentent une surexpression de l'AOX ainsi qu'une activité AOX plus intense que celle retrouvée dans les lignées sauvages. Ce sont de nouveaux exemples de régulation de l'AOX par l'altération des fonctions respiratoires. La protéine ORF138 ne comporte pas de séquences provenant de gènes codant des sous-unités identifiées comme de nombreuses protéines de SMC. De plus, nous n'avons détecté aucune différence significative dans le profil observé en BN-PAGE des complexes respiratoires entre mitochondries isolées de colzas mâle stériles ou fertiles. Il serait donc envisageable que la protéine ORF138 provoque directement ou bien très indirectement une augmentation de l'AOX par un mécanisme différent.

Ces altérations des activités respiratoires mitochondriales sont présentes et maintenues dans les populations sauvages, en tout cas dans la SMC de la betterave. C'est une situation qui peut paraître contradictoire avec le maintien d'une bonne vigueur des plantes mâle stériles. Il est possible que ces perturbations confèrent aux plantes mâle stériles un avantage sélectif. Les altérations des activités respiratoires induiraient un stress cellulaire qui serait compensé par l'activation de mécanismes de réponse, révélée par la surexpression de l'AOX. Les plantes mâles stériles seraient alors en "alerte" par rapport aux plantes sur cytoplasme "normal" et pourraient ainsi répondre plus efficacement aux situations de stress. Le résultat serait alors une vigueur accrue dans des conditions adverses, comme cela a été observé chez les mutants de *N. sylvestris* (Dutilleul et al. 2003). Ces mécanismes de réponse au stress induit par le cytoplasme de stérilité seraient cependant insuffisants dans les cellules du tapis, rendant les altérations respiratoires complètement délétères pour le développement normal du tissu (Budar et al. 2003).

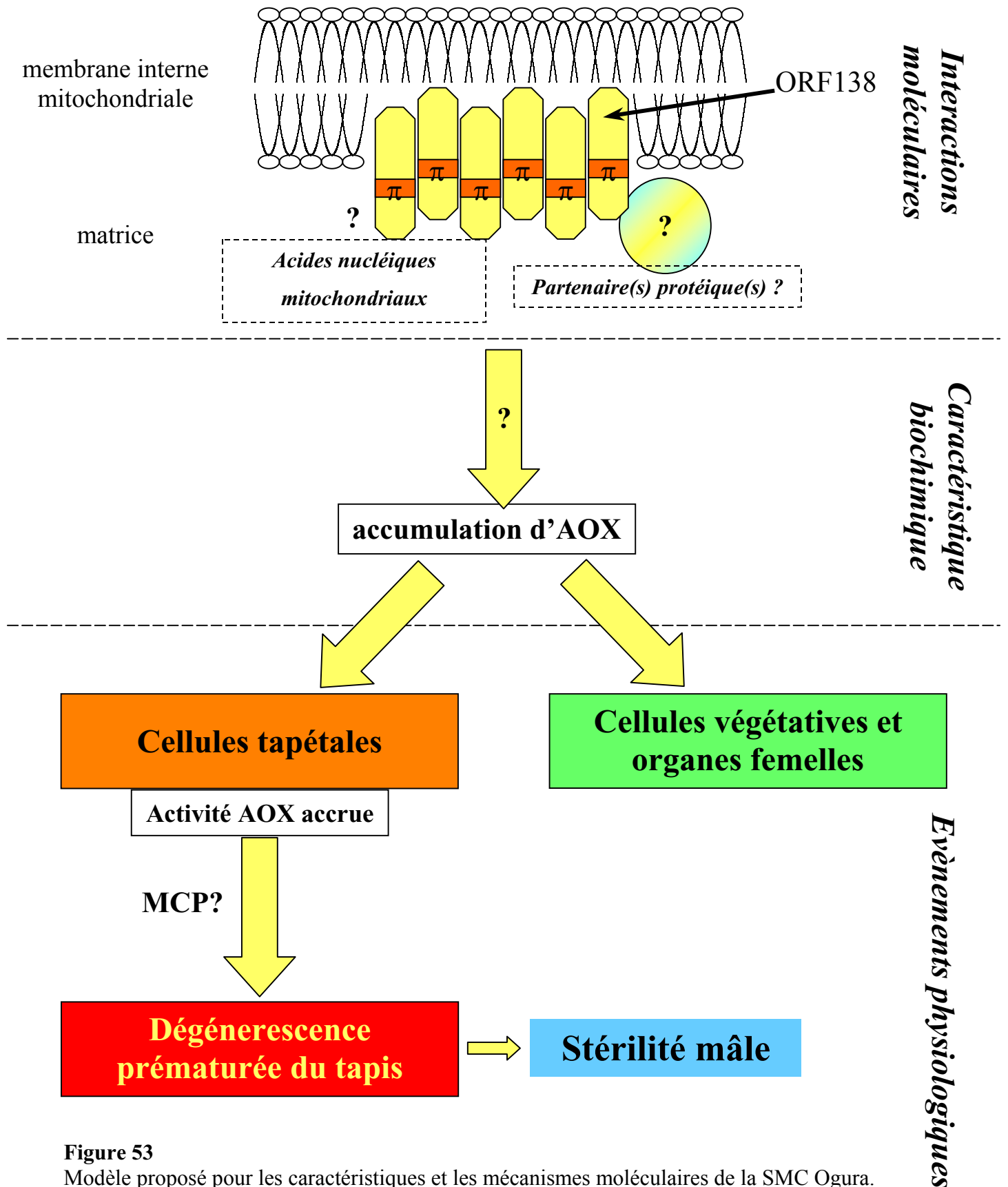
Dans notre cas, la protéine ORF138 provoque chez la levure une hypersensibilité à un stress oxydatif. Sa présence est associée à une accumulation plus importante d'AOX chez les plantes mâle stériles. Il est nécessaire d'étudier si elle est également associée à un stress oxydatif chez les plantes et de le relier ou non à l'altération éventuelle des activités respiratoires mitochondriales ou à d'autres mécanismes physiologiques en rapport avec le stress oxydatif.

# CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de cette thèse nous permettent de proposer un modèle sur le mode d'action de la protéine ORF138 (figure 53). La protéine ORF138 est donc une protéine intrinsèque à la membrane interne mitochondriale et est associée sous la forme d'homooligomères. Cette insertion permet une exposition exclusivement matricielle des résidus non impliqués dans l'insertion dans la membrane. Ces propriétés structurales sont probablement acquises au sein de la membrane grâce à la présence de deux domaines distincts au moins. Un domaine de 15 résidus jouerait également un rôle primordial dans la bonne conformation de la protéine. L'association de la protéine ORF138 à des partenaires protéiques et/ou nucléiques permettrait l'établissement d'un complexe de taille apparente supérieure à 750 kDa. La présence de ce complexe déclencherait la mise en place de mécanismes liés à un stress oxydant. Le lien entre ce stress oxydant et la mort prématurée des cellules tapétales reste encore à prouver mais constitue une des pistes les plus prometteuses pour l'élucidation du mécanisme de stérilité.

Toutes les données recueillies pendant cette thèse, me conduisent à penser que la protéine ORF138 possède des caractéristiques qui lui permettent de provoquer un effet dans tous les systèmes étudiés de façon relativement autonome. Ses caractéristiques pourraient éventuellement la rapprocher de la protéine T-URF13, en particulier si on considère sa capacité à former des homooligomères dans la membrane interne mitochondriale. L'absence de partenaires protéiques identifiés, à ce jour, renforce cette hypothèse. Les prochaines étapes clés dans cette étude passionnante de la SMC Ogura sont, à mon avis, la description détaillée et approfondie des événements cellulaires précédant et accompagnant la dégénérescence du tapis chez les plantes mâle stériles, afin de discriminer définitivement une mort cellulaire programmée d'un processus original, et l'identification du lien qui existe entre la présence de l'ORF138 au sein de la membrane interne mitochondriale et la surexpression d'AOX. Les informations recueillies alors permettront d'étoffer et d'affiner le modèle proposé lors de ce travail.





**Figure 53**

Modèle proposé pour les caractéristiques et les mécanismes moléculaires de la SMC Ogura.

AOX : alternative oxydase

MCP : mort cellulaire programmée

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## **1-/ MATERIELS**

### 1-1/ Plantes

#### 1-1-1/ Colza

Les cultivars de colza (*Brassica napus*) utilisés dans cette étude sont *Brassica napus* cv Pactol Fertile et *Brassica napus* cv Pactol SMC. Ces lignées sont isogéniques pour leur noyau mais possèdent des cytoplasmes différents. La lignée fertile possède un cytoplasme de colza (*nap*) alors que la lignée stérile possède le cytoplasme d'un cybride stérile (Fu58) (Pelletier et al. 1983).

#### *1-1-1-1/ Conditions de culture en serre*

Les graines de colza sont semées sur un terreau standard et les plantules sont cultivées en serre pendant 4 à 6 semaines en conditions d'éclairement de jours courts (8 heures d'éclairement). Elles subissent ensuite un durcissement au froid (6 à 7°C) pendant 3 semaines en conditions d'éclairement de jours longs (12 heures d'éclairement). Elles sont ultérieurement transférées et cultivées en serre et quotidiennement arrosées à la solution nutritive. Dans ces conditions de cultures, les génotypes utilisés fleurissent à l'âge de 20 semaines environ. Les inflorescences peuvent être récoltées plusieurs fois (de 8 à 12 fois) dans ces conditions.

#### *1-1-1-2/ Conditions de culture des plantules étiolées*

Les graines de colza sont semées très densément sur un terreau standard et maintenues à l'obscurité pendant 5 à 6 jours avec un arrosage quotidien à la solution nutritive.

#### 1-1-2/ *Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* utilisées pour les transformations génétiques sont d'écotype Wassilevskija (WS) et sont cultivées en serre (16h d'éclairement par jour) sur un terreau standard.

## 1-2/ Souches de bactéries

### 1-2-1/ *E. coli*

Les souches d'*Escherichia coli* utilisées pour les clonages et l'expression de protéines hétérologues sont respectivement : la souche DH10B (F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ<sup>-</sup> *rpsL**nupG*) et la souche BL21(DE3)pLysS (F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*(*r<sub>B</sub>*- *m<sub>B</sub>*-) *dcm, gal* (DE3) pLysS, Cm<sup>R</sup>).

La souche XL1blue (*recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F'*proAB lacI*<sup>q</sup>ZΔ*M15* Tn10 (Tetr)<sup>c</sup>]) est utilisée lors de la mutagenèse dirigée et incluse dans le kit Quickchange (Stratagene, La Jolla, USA).

### 1-2-2/ *Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58C1 pMP90 (Koncz et al. 1986) a été utilisée pour les transformations génétiques d'*Arabidopsis thaliana* dans cette étude. Elle est dérivée de la souche sauvage C58 et possède les gènes de résistance à la rifampicine et à la gentamycine respectivement situés sur le chromosome bactérien et le plasmide Ti désarmé. Elle a servi de souche réceptrice aux différents vecteurs binaires utilisés au cours de ce travail.

## 1-3/ Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae*

La souche de levure utilisée pour l'expression des différentes protéines à adressage mitochondrial est la souche BY384 (*Mata*; *his3D25*; *leu2D1*; *lys2D2102*; *trp1D63*; *ura3-52*), fournie par J. Boeke (John Hopkins University, Baltimore, USA).

## 1-4/ Plasmides

### 1-4-1/ Vecteurs de clonages

Le plasmide pBluescript (Stratagene, La Jolla, USA) est utilisé pour les clonages intermédiaires.

Les plasmides pCR II-TOPO, pCR 2.1-TOPO et pCR Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) sont utilisés pour le clonage des fragments PCR.

### 1-4-2/ Vecteurs d'expression bactérienne

L'expression des différentes formes sauvages, mutantes et tronquées de l'ORF138 chez *E. coli* a été permise grâce au vecteur pET29a(+) (Novagen, Darmstadt, Allemagne).

### 1-4-3/ Vecteurs binaires

Le vecteur binaire utilisé dans les transformations génétiques de plantes est le pEC2 (Cartea et al. 1998). Il comprend entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T un site multiple de clonage et un gène de résistance au glyphosate d'ammonium (Basta) sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). Il porte un gène de résistance à la kanamycine pour sa sélection dans l'agrobactérie.

### 1-4-4/ Vecteurs d'expression de levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le vecteur pRS426Met (Freire et al. 2000) utilisé pour l'expression de protéines dans la levure est un vecteur pRS426 (Christianson et al. 1992) portant une cassette d'expression avec le promoteur Met25 du gène de la sulfhydrylase et le terminateur du gène de la 3' phosphoglycérate kinase. Le promoteur Met25 est réprimé par la méthionine.

### 1-5/ Oligonucléotides

Les séquences des oligonucléotides sont données de 5' en 3' dans le tableau 6 et les sites de restriction introduits dans ces séquences sont soulignés. La température à laquelle 50% des molécules sont dénaturées ( $T_m$ ) est également indiquée.

### 1-6/ Milieux de culture

#### Luria Bertani (LB)

Bactotryptone	1 % (p/v)
Extrait de levure	0,5 % (p/v)
NaCl	170 mM
pH	7,5

#### Milieux synthétiques complets –Ura (SC-U)

Yeast Nitrogen Base (DIFCO)	0,67 % (p/v)
Dropout –Ura (Bio101)	0,077 % (p/v)
Substrat	*
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM

#### SOC

Bactotryptone	2 % (p/v)
Extrait de levure	0,55 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

#### Milieux synthétiques complets –Ura –Met (SC-U-M)

Yeast Nitrogen Base	0,67 % (p/v)
Dropout –Ura –Met (Bio101)	0,073 % (p/v)
Substrat	*
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM

#### YPD

Bactopetpone	2 % (p/v)
Yeast extract	1 % (p/v)
Glucose	2 % (p/v)

\* Les substrats carbonés des milieux SC-U, SC-U-M sont Glucose (2 % p/v) ou Raffinose (2 % p/v) ou Glycérol + Ethanol (3 % v/v + 2 % v/v)

Les milieux SC-U, SC-U-M et YPD sont complétés de 2,5 % d'agar (p/v) pour une utilisation en milieu gélosé.

#### Milieu de culture *A. thaliana*

KNO <sub>3</sub>	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2mM
Microéléments	1X
Vitamines (Morel)	1X
BCP	0,0008 % (p/v)
MES	0,07 % (p/v)
Saccharose	1 % (p/v)
Citrate de fer	0,005 % (p/v)
Agar	0,7 % (p/v)
pH	5,8

#### Microéléments 1000X

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	70 mM
MnCl <sub>2</sub>	14 mM
CuSO <sub>4</sub>	0,5 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,2 mM
NaCl	10 mM
ZnSO <sub>4</sub>	1 mM
CoCl <sub>2</sub>	0,01 mM

#### Vitamines (Morel) 500X

Myo-Inositol	5 % (p/v)
Panthotenate	0,05 % (p/v)
Niacine	0,05 % (p/v)
Pyridoxine	0,05 % (p/v)
Thiamine	0,05 % (p/v)
Biotine	0,005 % (p/v)

nom de l'oligo	séquence 5'-3'	Tm (°C)	commentaires
T7	TAATACGACTCACTATAGGGG	50,8	oligonucléotide pour la délétion des acides aminés 77 à 138 de l'ORF138 ; brin+
M13reverse	GGAAACAGCTATGACCATGAT	60,4	construction du vecteur de destination des fragments mutagénisés par PCR ; brin - oligonucléotide pour l'amplification du terminateur CaM
M13Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT	66,5	oligonucléotide pour l'amplification des fragments lors de la PCR en conditions mutagènes ; brin +
oligo1	GGTCCTAGGAAGATGAGTA	53	construction du vecteur de destination des fragments mutagénisés par PCR ; brin+ ; Le site <i>Bln</i> I est souligné.
oligo2	TACTCATCTTCTTAGGACC	53	oligonucléotide pour l'amplification des fragments lors de la PCR en conditions mutagènes ; brin - ; Le site <i>Bln</i> I est souligné.
oligo3	TTGTCCACTTTTGGCATAAATCTCACT	61	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée sur la cystéine 12 de l'ORF138 ; brin +
oligo4	AGTGAGATTATGCGCAAAGTGGACAA	61	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée sur la cystéine 12 de l'ORF138 ; brin -
oligo5	ACTCCTACTGAAGCCAAAGTTAGTGTA	54	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée sur la cystéine 20 de l'ORF138 ; brin +
oligo6	TACACTAACTTTGGCTTCAGTAGGAGT	54	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée sur la cystéine 20 de l'ORF138 ; brin -
oligo7	AACAACCAACATGCCTTACGAACCATG	63	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée sur la cystéine 49 de l'ORF138 ; brin +
oligo8	CATGGTTCGTAAGGCATGTTGGTTGTT	63	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée sur la cystéine 49 de l'ORF138 ; brin -
oligo9	AGACATCTAGAGAAGTTAAAAATTAATCA AATGTACCTAACGATGAA	66	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée de délétion des acides aminés 62 à 76 de l'ORF138 ; brin +
oligo10	TTCATCGTTAGGTACATTTGATTTAATTTT TAACTTCTCTAGATGTCT	66	oligonucléotide pour la mutagenèse dirigée de délétion des acides aminés 62 à 76 de l'ORF138 ; brin -
oligo11	GCTCGAGTGTAATTTTGACACC	51	oligonucléotide pour la délétion des acides aminés 77 à 138 de l'ORF138 ; brin- ; le site <i>Xho</i> I est souligné
oligo12	ATCTAGACATAACGGTGAGAGTTAATA	50	oligonucléotide pour l'amplification du promoteur A9 ; brin + ; le site <i>Xba</i> I est souligné.
oligo13	TGGTACCTCTAATTAGATACTATATTG	46	oligonucléotide pour l'amplification du promoteur A9 ; brin - ; le site <i>Kpn</i> I est souligné.
oligo14	TCTCGAGCAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG A	77	oligonucléotide pour l'amplification du terminateur CaMV ; brin + ; le site <i>Xho</i> I est souligné.

**Tableau 6**

Tableau décrivant les différents oligonucléotides (et leurs caractéristiques) utilisés lors de ce travail

## 2-/ METHODES

### 2-1/ Biologie moléculaire

#### 2-1-1/ Extraction d'ADN

##### *2-1-1-1/ Préparation d'ADN plasmidique de bactérie*

Les plasmides d'intérêt sont extraits à l'aide des kits Nucleospin Plasmid, Nucleobond PC100 ou Nucleobond PC500 (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur.

##### *2-1-1-2/ Préparation d'ADN génomique d'Arabidopsis thaliana*

Les extractions d'ADN génomique de transformants d'*Arabidopsis thaliana* ont été réalisées grâce à la méthode d'Edwards (Edwards et al. 1991) modifiée.

1 à 2 feuilles de rosette sont broyées dans l'azote liquide. 400 µL de tampon d'extraction préchauffé à 65°C sont alors ajoutés. Les échantillons sont incubés pendant 1 heure à 65°C puis centrifugés à 13000 g à température ambiante pendant 10 minutes. Le surnageant est alors transféré dans un tube contenant 400 µL d'isopropanol, puis les échantillons sont de nouveau centrifugés à 13000 g à température ambiante pendant 10 minutes. Le surnageant est alors éliminé et le culot séché à l'air. Le culot d'ADN est resuspendu dans 50 µL de TE et laissé à 4°C pendant une nuit.

#### Tampon d'extraction

Tris 100 mM  
EDTA 10 mM  
NaCl 700 mM  
SDS 1% (p/v)  
pH 7,5

#### TE

Tris 10 mM  
EDTA 1 mM  
pH 7,5



### 2-1-2/ PCR mutagène

Cette méthode a été décrite par (Cadwell et al. 1994). Elle consiste à effectuer une PCR en utilisant du chlorure de magnésium, du chlorure de manganèse et un déséquilibre dans les proportions de dNTP. Dans ces conditions, la fidélité de la *Taq* polymérase diminue grandement et permet ainsi l'introduction de mutations tout le long de la séquence amplifiée. Les fragments obtenus sont sous clonés puis séquencés afin d'identifier les mutations et de déterminer leurs effets. Un témoin de PCR non mutagène (en conditions standard) est effectué en parallèle permettant d'évaluer la fréquence d'apparition de mutations dans les conditions expérimentales.

La PCR mutagène a donc été utilisée pour introduire des mutations le long de la séquence du gène *orf138*. Les oligonucléotides utilisés pour cette réaction sont M13Fwd et oligo2 (voir tableau 6).

Le mélange réactionnel est constitué de 0,4 nM de plasmide, 0,4 µM de chaque oligonucléotide, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dATP, 1 mM de dCTP, 1 mM de dTTP, du tampon de réaction 1X (Eurobio, Courtaboeuf, France), de 7 mM MgCl<sub>2</sub>, de 0,5 mM MnCl<sub>2</sub> et de 5 unités de *Taq* polymérase (Eurobio) dans un volume de 50 µL. Les conditions de la réaction sont les suivantes : 94 °C pendant 1 minute ; 30 cycles de (94 °C pendant 1 minute, 50 °C pendant 1 minute et 72 °C pendant 1 minute) et 72°C pendant 10 minutes.

### 2-1-3/ Mutagénèse dirigée

Pour introduire des mutations ponctuelles et des délétions sur les séquences d'intérêt, le kit QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, USA) a été utilisé. Les réactions ont été effectuées selon les recommandations du fournisseur.

#### 2-1-4/ Electrophorèse d'ADN

Pour les analyses ou la vérification des profils de restriction, les gels utilisés sont réalisés en tampon TAE1X avec des pourcentages variables en agarose. La migration s'effectue à 80-100 V pendant 1 heure environ.

#### TAE 1X

Tris 40 mM

Acetate 20 mM

EDTA 1mM

pH 8,5

#### 2-1-5/ Clonage

L'ADN plasmidique est digéré par les enzymes de restriction appropriées (BRL, Redmond, USA ; Amersham, Buckinghamshire, Angleterre ou Fermentas, Vilnius, Lithuanie). Le tampon utilisé ainsi que les conditions de température et de durée d'incubation sont ceux indiqués par le fournisseur. Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose 1% (p/v) en tampon TAE 1X avec du BET à  $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$

#### *2-1-5-2/ Purification de fragments d'ADN (sur gel d'agarose et PCR)*

Les fragments d'ADN contenus dans des morceaux de gel découpés après électrophorèse ou dans des réactions d'amplification sont purifiés à l'aide du kit Nucleospin extract (Macherey-Nagel).

#### *2-1-5-3/ Déphosphorylation des extrémités 5'*

Le plasmide est mis à incuber avec 0,1 unité de phosphatase alcaline de crevette (SAP) dans le tampon utilisé lors de la digestion, dans un volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Après incubation à 37°C pendant 1 heure, l'enzyme est inactivée pendant 30 minutes à 70°C.

#### 2-1-5-4/ Ligatures

La ligature est réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 20 à 40 ng de vecteur digéré par les enzymes appropriées, 100 à 200 ng d'insert, du tampon de T4 ligase (BRL, Redmond, USA ; Amersham, Buckinghamshire, Angleterre ou Fermentas, Vilnius, Lituanie) et 2U de T4-DNA ligase (BRL, Amersham ou Fermentas). Dans le cas de ligature avec les vecteurs de type pTOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA), la ligature s'effectue pendant 5 minutes à température ambiante dans le tampon et selon les recommandations données par le fournisseur. Après une nuit à 16°C ou 5 minutes à température ambiante, la ligature est dialysée à travers une membrane de nitrocellulose ayant des pores de 0,025 µm (Millipore, Billerica, USA).

#### 2-1-5-5/ Transformation génétique de bactéries

##### 2-1-5-5-1/ Electroporation d'*E. coli* DH10B et d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pMP90

La souche désirée est mise en culture dans 1L de milieu LB. Quand la DO à 600 nm atteint 0,3, la culture est centrifugée à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec un volume d'eau distillée stérile et froide. Un deuxième lavage est effectué et les bactéries sont reprises dans 1/2 volume d'eau distillée stérile et froide puis centrifugées à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 10 mL d'une solution de glycérol à 10% (v/v) puis le mélange est centrifugé à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C. Après avoir repris le culot bactérien dans 1mL d'une solution de glycérol à 10% (v/v) la DO à 600 nm est vérifiée (0,2-0,3 après une dilution au 1/1000). Les bactéries électrocompétentes sont aliquotées par 40 µL et stockées à -80°C.

40 µL de bactéries compétentes sont mélangés avec 1 µL de ligature et l'ensemble est placé dans une cuve à électroporation de 2 mm de largeur. Après application d'un choc électrique de 12,5 kV.cm<sup>-1</sup> pour *E. coli* et de 10 kV.cm<sup>-1</sup> pour *A. tumefaciens*, 1 mL de milieu SOC ou LB est immédiatement ajouté et les bactéries sont mises à 37°C pendant 1h. 1/10 et 9/10 des bactéries électroporées sont étalés sur milieu sélectif contenant du Xgal (80 µg.mL<sup>-1</sup>) et de l'IPTG (20 mM) si un criblage blanc / bleu est effectué.

#### 2-1-5-5-2/ *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Les transformations routinières de la souche d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS ont été effectuées grâce à la méthode utilisant du CaCl<sub>2</sub> décrite par (Maniatis et al. 1982) et les transformations pour le criblage de la banque de mutants d'*orf138* ont été réalisées en utilisant les bactéries BL21 Gold(DE3)pLysS compétentes fournies par la société Stratagene (La Jolla, USA).

#### 2-1-5-6/ Transformation génétique de levure *Saccharomyces cerevisiae*

La souche de levure BY384 a été transformée avec les différents plasmides d'intérêt au moyen d'une technique de transformation rapide et en une seule étape comme décrit par (Gietz et al. 1995).

#### 2-1-6/ Séquençage

Les plasmides d'intérêt sont extraits à l'aide du kit Nucleospin Plasmid (Macherey Nagel). La qualité et la quantité de plasmide extrait sont estimées sur gel. Une solution à 120 ng.μL<sup>-1</sup> est envoyée à la société Genome Express pour séquençage. Les oligonucléotides sont éventuellement fournis à raison une concentration de 2 pmol.μL<sup>-1</sup>.

## 2-1-7/ Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

D'après (Bechtold et al. 1993)

### *2-1-7-1/ Réalisation*

Un litre de LB additionné d'antibiotiques estensemencé avec 20 mL de préculture d'Agrobactéries et mis à incuber à 28°C pendant environ 14 heures pour obtenir une culture de densité proche de 0,8 unités d'absorbance à 600 nm par mL. La culture est ensuite centrifugée à 6000 g pendant 5 minutes. Le culot de bactéries est resuspendu dans un litre de solution d'infiltration. Les hampes florales des plantules âgées de 4 à 6 semaines sont alors immergées pendant 2 minutes puis les plantes sont recouvertes d'une mini-serre pendant 2 à 3 jours. L'arrosage est poursuivi jusqu'à la fin de la floraison puis les plantes sont laissées à sécher progressivement. Les plantes infiltrées T0 sont ensuite mises en sachets et leurs graines récoltées.

#### Solution d'infiltration :

Saccharose 5% (p/v)

Silwet 0,02% (v/v)

### *2-1-7-2/ Sélection des transformants*

La sélection des graines T1 (descendance des plantes T0) transformées se fait sur sable humidifié à l'eau additionnée de l'herbicide Basta (10 mg.L<sup>-1</sup>) pendant deux semaines puis à la solution nutritive additionnée de Basta (10 mg.L<sup>-1</sup>) pendant deux semaines supplémentaires. Après 4 semaines, les plantules transformées se différencient des plantules sauvages par la présence des 2 premières feuilles alors que les plantules sauvages sont bloquées au stade cotylédonaire. Au stade 4 à 5 feuilles, les transformants T1 sont alors repiqués en pots individuels et après floraison, autofécondation et fructification les graines T2 sont récoltées plante à plante.

### 2-1-8/ Expression transitoire par bombardement

Le bombardement d'épiderme d'oignon a été réalisé comme décrit par (Weigel et al. 2001). 3 à 10 µg de chaque construction ont été utilisés pour transformer les cellules d'épiderme d'oignon (*Allium sativum*). Les bombardements ont été réalisés avec un canon à particule PDS-1000/HE Biolistic Particle Delivery System (BioRad, Hercules, USA) en utilisant des disques de rupture de 900 psi (Biorad). Les explants sont ensuite incubés pendant 48 à 72 heures en chambre de culture sur un milieu solide (Murashige et al. 1962). Les épidermes sont montés entre lame et lamelle juste avant observation.

### 2-1-9/ Analyses microscopiques

Les observations ont été effectuées sur un microscope confocal ou à épifluorescence. Le microscope confocal utilisé est un LEICA TCS-NT (Leica Mycrosystems, Wetzlar, Allemagne) avec un laser argon/krypton (Omnichrome). Le signal GFP est collecté par un filtre FITC (BP520/530) à 488 nm. Le microscope à épifluorescence utilisé est un LEICA DMRXA2 couplé à une caméra monochromatique coolsnap HQ. Le signal GFP est collecté par un couple de filtres BP500/550 pour l'émission et BP450/490 pour l'excitation.

## 2-2/ Biochimie

### 2-2-1/ Manipulations résolutives

#### *2-2-1-1/ Isolement de mitochondries*

##### 2-2-1-1-1/ Isolement de mitochondries d'hypocotyles étiolés de colza

Des plantules étiolées de colza CMS et fertile sont prélevées et immédiatement mises sur glace. Les plantules sont broyées à l'aide d'un mixer Waring (Hartford, USA) par 3 coups de 3 secondes en vitesse basse avec environ 200 mL de tampon de broyage pour 100 g de tissu frais. Le broyat est ensuite filtré sur 4 couches de Miracloth (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne) et les débris cellulaires sont ensuite éliminés par deux centrifugations successives à 1000 g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube et une centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 20 minutes permet de récupérer un culot enrichi en organites. Les mitochondries sont alors séparées des autres organites à l'aide d'un gradient discontinu de Percoll (4 mL 50% / 5 mL 20% / 2,5 mL 14% (v/v) Percoll dans du tampon de lavage) lors d'une centrifugation à 9800 g à 4°C pendant une heure. Les mitochondries se retrouvant à l'interface 50/20 sont prélevées et diluées au moins 4 fois avec du tampon de lavage puis récupérées à l'aide d'une centrifugation à 15000 g à 4°C pendant 20 minutes. Un nouveau lavage est effectué et les mitochondries sont finalement reprises dans un minimum de volume de tampon de lavage.

#### Tampon de broyage :

Saccharose	0,3 M
Tetrasodiumpyrophosphate	25 mM
EDTA	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
PVP-40	1 % (p/v)
BSA	1 % (p/v)
Ascorbate	20 mM
pH 7,5	

#### Tampon de lavage :

Saccharose	0,3 M
Hepes	10 mM
BSA	0,2 % (p/v)
pH 7,5	

#### 2-2-1-1-2/ Isolement de mitochondries de boutons floraux de colza

Des boutons floraux non éclos de colzas stérile ou fertile sont prélevés et immédiatement mis sur glace. Les boutons sont broyés à l'aide d'un mixer par 3 fois 3 secondes à basse vitesse avec environ 200 mL de tampon de broyage pour 50 g de tissus frais. Le broyat est ensuite filtré sur 4 couches de Miracloth et les débris cellulaires sont ensuite éliminés par une centrifugation à 1000 g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube et une centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 20 minutes permet de récupérer les organites. Le culot est alors resuspendu délicatement à l'aide d'un pinceau dans du tampon de lavage. La solution est alors soumise aux mêmes centrifugations que le broyat cellulaire afin d'obtenir une solution enrichie en organites. Les mitochondries sont alors séparées des autres organites à l'aide d'un gradient linéaire de PVP-40 (0 à 4,4% p/v) dans la solution de gradient lors d'une centrifugation à 40000 g à 4°C pendant 40 minutes. Les mitochondries se retrouvent au fond du tube séparées des autres organites restés en haut du tube. Elles sont prélevées et diluées au moins 6 fois avec du tampon de lavage et récupérées à l'aide d'une centrifugation à 15000 g à 4°C pendant 20 minutes. Un nouveau lavage est effectué et les mitochondries sont finalement reprises dans un minimum de volume de tampon de lavage.

##### Solution de gradient :

Tampon de lavage 1X

Percoll                    28 % (v/v)

#### 2-2-1-1-3/ Isolement de mitochondries de levures

Les mitochondries de levure sont isolées à partir de 4 litres de milieu SC-U-M Raffinose par la méthode enzymatique décrite par (Guerin et al. 1979). Si les mitochondries subissent un fractionnement, elles sont préalablement reprises dans le tampon suivant : 250 mM Saccharose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10 mM Hepes pH7,2.



## *2-2-1-2/ Fractionnements mitochondriaux*

### *2-2-1-2-1/ Fractionnements de mitochondries de colza et traitements à la protéinase K*

Les membranes mitochondriales sont séparées à l'aide d'un choc osmotique ménagé permettant le gonflement du mitoplaste (matrice et membrane interne) et ainsi la rupture de la membrane externe. L'osmolarité de la solution est ensuite ajustée à sa valeur de départ pour permettre le rétrécissement du mitoplaste. Les vésicules sont alors séparées selon leur densité sur un gradient discontinu de saccharose.

Les mitochondries sont donc diluées avec du tampon hypotonique pour arriver à une concentration en saccharose de 10 mM. Le choc osmotique se déroule pendant 20 minutes à 4°C sous agitation douce. La concentration en saccharose est alors ajustée à 0,3 M à l'aide d'une solution hypertonique et la rétraction des mitoplastes est effectuée pendant 20 minutes à 4°C sous agitation douce. Ensuite la totalité de la solution est déposée sur un gradient discontinu de saccharose (3 mL 45 %, 7 mL 32% , 4mL 15% (p/v) saccharose dans 10 mM Hepes pH7,2) et les membranes sont séparées par centrifugation à 150000 g à 4°C pendant une heure dans un rotor à angle libre (TST 41-14, Kontron, Plaisir, France). Les vésicules de membranes externes à l'interface 15/32 et les mitoplastes à l'interface 32/45 sont prélevés et dilués avec du tampon hypotonique. Les membranes sont alors recueillies par centrifugation à 100000 g à 4°C pendant une heure et resuspendues dans un minimum de volume de tampon hypotonique.

#### Tampon hypotonique

Hepes            10 mM  
pH 7,2

#### Tampon hypertonique

Saccharose    2 M  
Hepes            10 mM  
pH 7,2

Dans le cas des traitements à la protéinase K, les mitoplastes sont récupérés par centrifugation à 15000 g à 4°C pendant 20 minutes puis resuspendus avec du tampon de lavage. La protéinase K et/ou le triton X-100 sont ajoutés respectivement à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,05% (v/v). Les échantillons sont incubés à 4°C pendant 30 minutes et du PMSF est ajouté à une concentration finale de 2 mM pour inhiber la protéinase K.

## 2-2-1-2-2/ Fractionnement de mitochondries de levures

Les mitochondries sont diluées avec du tampon hypotonique pour arriver à une concentration en saccharose de 10 mM. Le choc osmotique se déroule pendant 20 minutes à 4°C sous agitation douce. La concentration en saccharose est alors ajustée à 0,25 M à l'aide d'une solution hypertonique et la rétraction des mitoplastes est effectuée pendant 20 minutes à 4°C sous agitation douce. Ensuite la totalité de la solution est déposée sur un gradient discontinu de saccharose (3 mL 60 %, 7 mL 35% , 4mL 25% (p/v) saccharose dans 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10 mM Hepes pH7,2) et les membranes sont séparées par centrifugation à 150000 g à 4°C pendant une heure dans un rotor à angle libre. Les vésicules de membranes externes à l'interface 25/35 et les mitoplastes à l'interface 35/60 sont prélevés et dilués avec du tampon hypotonique. Les membranes sont alors récoltées par centrifugation à 100000 g à 4°C pendant une heure et resuspendues dans un minimum de volume de tampon hypotonique.

### Tampon hypotonique

Hepes	10 mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
pH 7,2	

### Tampon hypertonique

Saccharose	2 M
Hepes	10 mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
pH 7,2	

### 2-2-1-3/ Fractionnement et traitement de membranes

#### 2-2-1-3-1/ Préparation de fractions solubles et insolubles d' *E. coli*

Les bactéries exprimant l'ORF138 ou l'ORF138 $\Delta$ 1-43 (voir paragraphe 2-3-1) sont recueillies, respectivement 3 heures et 1 heure après induction, par centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot de bactéries est pesé puis congelé dans l'azote liquide et décongelé immédiatement à température ambiante. Du tampon de dilution est ajouté à raison de 7 mL par gramme de culot bactérien. Le volume ainsi obtenu est réparti dans 2 tubes et mis sous agitation douce pendant une heure à 4°C. Une centrifugation à 50000 g pendant 30 minutes à 4°C permet la séparation des fractions solubles (surnageant) et des fractions insolubles (culot). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et chaque culot est resuspendu dans 1 mL de tampon de dilution contenant de l'urée à 8M ou bien du n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside (un détergent) à 0,5 % (p/v). Chaque tube est mis sous agitation douce pendant 30 minutes à 4°C. Une nouvelle centrifugation à 50000 g pendant 30 minutes à 4°C permet la séparation des fractions solubles et insolubles. Les culots sont ensuite resuspendus dans 1 mL de tampon de dilution.

#### Tampon de dilution

Tris HCl	100 mM
NaCl	200 mM
Glycérol	10% (v/v)
MgSO <sub>4</sub>	5 mM
DNAse I	1 mg.mL <sup>-1</sup>
pH	7,5

#### 2-2-1-3-2/ Fractionnement de membranes d' *E. coli*

Les bactéries exprimant l'ORF138 (voir paragraphe 2-3-1) sont récoltées par centrifugation à 5000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans une solution tampon de phosphate de sodium à 25 mM pH 7,0 de manière à concentrer 100 fois les cellules. La lyse est effectuée par un seul passage à la presse de French à 16000 psi. Les débris cellulaires ainsi que les cellules non lysées sont éliminés par une centrifugation à 12000 g pendant 4 minutes à 4°C.

Trois mL de lysat sont ensuite déposés sur un gradient discontinu de saccharose de 9 mL comportant 2 mL de 68% (p/v) saccharose et 7 mL de 45 % (p/v) saccharose dans du tampon phosphate de sodium 25 mM pH 7,0. Les membranes sont séparées par une centrifugation à 250000 g pendant 20 heures à 4°C dans un rotor à angle libre (TST 41-14, Kontron, Plaisir, France). Les vésicules de membranes externes de couleur brun foncé au-dessus du gradient ainsi que les vésicules de membranes cytoplasmiques de couleur brun clair à l'interface 68/45 sont récoltées et diluées au moins 5 fois avec une solution 100 mM Tris-HCl pH 7,5. Les membranes sont ensuite récupérées par une centrifugation à 250000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les vésicules sont ensuite précautionneusement lavées avec la même solution et de nouveau récoltées à l'aide d'une centrifugation à 250000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les membranes sont alors reprises dans un minimum de volume de 100 mM Tris-HCl pH 7,5.

#### 2-2-1-3-3/ Traitements alcalins des membranes

Les échantillons à traiter sont incubés pendant 30 minutes à 4°C dans une solution de 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11,5 et sont ensuite centrifugés à 100000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contient les protéines solubles et les protéines membranaires périphériques. Le culot est resuspendu dans un minimum de volume de 100 mM Tris-HCl pH 7,5 et contient les protéines membranaires intrinsèques.

#### *2-2-1-4/ Crosslink*

##### *2-2-1-4-1/ Crosslink au Diméthylpimélimidate (DMP)*

Le DMP est un crosslinker homobifonctionnel permettant l'établissement de liaisons covalentes entre deux groupements amines sans affecter la charge globale des protéines (Schneider et al. 1982). Les mitochondries sont resuspendues à une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup> soit dans une solution d'éthanolamine 200 mM à pH 9,0 soit dans une solution de triéthanolamine 200 mM à pH 8,0. Après 5 minutes à 4°C des quantités croissantes de DMP sont ajoutées (concentrations finales : 0 ; 0,05 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 mM) et les échantillons sont laissés 1 heure sous agitation douce à 4°C. La réaction est arrêtée grâce à l'ajout d'une solution à 2 M Tris-HCl pH 7,5 jusqu'à atteindre une concentration finale de 100 mM.

##### *2-2-1-4-2/ Crosslink au formaldéhyde et isolement de fractions nucléoprotéiques*

Cette manipulation est largement inspirée de la méthode décrite par (Kaufman et al. 2000). Le formaldéhyde est une petite molécule réactive pouvant créer des liaisons covalentes notamment entre les protéines et les acides nucléiques. Il est stable jusqu'à 70 °C et les liaisons formées peuvent être rompues par un traitement à 100°C par exemple. Les mitochondries (volume équivalent à 20 mg de protéines) sont resuspendues dans 10 mL de tampon de crosslink et le formaldéhyde est ajouté à une concentration finale de 1%. Un échantillon sans formaldéhyde est utilisé comme témoin. Les mitochondries sont ensuite incubées à 4°C pendant 20 heures sous agitation douce. La réaction est arrêtée par l'ajout de glycine 1M pH7,0 jusqu'à atteindre une concentration finale de 125 mM. Les mitochondries sont alors récoltées à l'aide d'une centrifugation à 15000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les mitochondries sont alors lysées dans 1 mL de tampon de lyse et incubées 10 minutes à 4°C puis 3 mL supplémentaires de tampon de lyse sont ajoutés. La solution est alors déposée sur un coussin de saccharose à raison de 6 mL de coussin pour 4 mL de lysat. Les structures de fortes densités sont culotées à travers le coussin de saccharose par centrifugation à 110000 g pendant une heure à 4°C dans un rotor à angle libre.

Le culot est alors repris au Potter dans 3,75 mL de tampon de dissociation et incubé à température ambiante pendant une heure afin de déstabiliser les complexes protéiques. La solution est ensuite ajustée à un indice de réfraction de 1,365 à l'aide d'une solution de chlorure de césium 4M réalisé avec du tampon du TE (cf. 2-1-1-2). Une centrifugation à 260000 g pendant 16 heures à 25°C dans un rotor à angle fixe permet la séparation des acides nucléiques libres, des acides nucléiques complexés aux protéines et des protéines libres. Des fractions de 1 mL sont ensuite collectées du haut vers le bas tube à l'aide d'une pompe péristaltique.

<u>Tampon de crosslink</u>		<u>Tampon de lyse</u>		<u>Solution de coussin de saccharose</u>		<u>Tampon de dissociation</u>	
Saccharose	0,3 M	Saccharose	0,3 M	Saccharose	20 %	Saccharose	0,3 M
Hepes	10 mM	Hepes	10 mM	Hepes	10 mM	Hepes	10 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM	NaCl	50 mM	EDTA	1 mM
EGTA	1mM	EGTA	1mM	NP-40	0,5 %	EGTA	1mM
NaCl	50 mM	NaCl	50 mM	pH 7,5		NaCl	50 mM
PMSF	1mM	PMSF	1mM			PMSF	1mM
Spermidine	1mM	Spermidine	1mM			Spermidine	1mM
pH 7,5		Glycine	500 mM			Sarkosyl	1%
		NP-40	0,5 %			pH 7,5	
		pH 7,5					

## 2-2-2/ Manipulations analytiques

### *2-2-2-1/ Dosages protéiques*

Les échantillons d'intérêt ont été dosés à l'aide du kit DC (Biorad) contre un gamme de BSA allant de 0,25 à 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 2-2-2-2/ Séparation en Blue Native-PAGE

### 2-2-2-2-1/ Préparation des échantillons

Un volume correspondant à 200 µg de protéines mitochondriales est centrifugé à 20000 g à 4°C pendant 20 minutes et le culot est resuspendu dans 40 µL de tampon de gel 1,5X. Après ajout de 5 µL d'une solution à 10 % de n-dodecyl-β-D-maltoside, les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 4°C. Les membranes sont alors éliminées à l'aide d'une centrifugation à 20000 g à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant contenant les complexes protéiques solubilisés est alors récupéré et 2,5 µL de solution SBG sont ajoutés. Les échantillons sont immédiatement déposés sur gel.

#### Tampon de gel 1X

Acide 6-aminocaproïque 500 mM  
Bistris 50 mM  
pH 7,5

#### Solution SBG

Acide 6-aminocaproïque 500 mM  
Serva Blue G 5 %

### 2-2-2-2-2/ Réalisation de la séparation

La séparation des complexes protéiques se fait à l'aide d'un gel à gradient linéaire d'acrylamide allant de 4% (haut du gel) à 12 ou 15% (bas du gel). La migration s'effectue à 2 mA constants pendant 20 heures en chambre froide avec le tampon de cathode I puis à 5 mA constants pendant 5 heures avec le tampon de cathode II, le tampon anode restant inchangé.

#### Tampon cathode I

Tricine 50 mM  
Bistris 15 mM  
Serva Blue G 0,02 %  
pH 7,0

#### Tampon cathode II

Tricine 50 mM  
Bistris 15 mM  
pH 7,0

#### Tampon Anode

Bistris 50 mM  
pH 7,0

## 2-2-2-3/ Séparation SDS-PAGE

### 2-2-2-3-1/ Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser sont resuspendus à la concentration désirée puis une solution Laemmli concentrée est ajoutée ainsi que du 2-mercaptoéthanol à une concentration finale de 5%. Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 à 15 minutes pour dénaturer les protéines et réduire les ponts disulfures.

Dans le cas d'une deuxième dimension dénaturante (consécutive à la première dimension native en BN-PAGE), une bande d'acrylamide découpée en BN-PAGE est incubée pendant au moins 30 minutes dans une solution de 1% (p/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoéthanol à température ambiante puis rincée 3 fois dans une solution de 1% (p/v) SDS.

#### Solution Laemmli 1X

Tris HCl pH 7,5	0,32 M
SDS	1 % (p/v)
Glycérol	5% (v/v)
Bleu de bromophénol	0,05 % (p/v)

### 2-2-2-3-2/ Réalisation de la séparation

La séparation des protéines s'effectue à l'aide d'un gel vertical de polyacrylamide/SDS. Le gel est formé d'une partie supérieure (gel dit de concentration à 4% d'acrylamide) et d'une partie inférieure (gel dit de séparation à 8 ou à 15% d'acrylamide). Les échantillons sont déposés et l'électrophorèse est réalisée à 200 V dans le tampon de migration.

<u>Gel de concentration</u>		<u>Gel de séparation 8 ou 15 %</u>		<u>Tampon de migration</u>	
0,5 M Tris HCl pH 6,8	0,625 mL	1 M Tris HCl pH 8,8	1,25 mL	Tris	25 mM
Acrylamide 30 % (37,5 : 1)	333 µL	Acrylamide 30 % (37,5 : 1)	1,33 ou 2,5 mL	Glycine	0,2 M
SDS 10 % (p/v)	25 µL	SDS 10 % (p/v)	50 µL	SDS	0,1 % (p/v)
H <sub>2</sub> O	1,5 mL	H <sub>2</sub> O	2,35 ou 1,15 mL		
APS 10 % (p/v)	12,5 µL	APS 10 % (p/v)	25 µL		
Temed	3,75 µL	Temed	3,75 µL		



#### *2-2-2-4/ Coloration des protéines au bleu de coomassie*

La détection des protéines s'effectue par la fixation non spécifique d'un colorant : le bleu de coomassie R250. Après l'électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de coloration pendant au moins une heure ce qui permet de précipiter les protéines et de fixer le colorant. Les protéines sont ensuite visualisées par décoloration du gel dans la solution de décoloration. Dans le cas des BN PAGE, le gel est d'abord décoloré dans la solution de décoloration pendant une nuit avant de subir les étapes de coloration / décoloration.

<u>Solution de coloration</u>		<u>Solution de décoloration</u>	
Ethanol	30 % (v/v)	Ethanol	30 % (v/v)
Acide acétique	10 % (v/v)	Acide acétique	10 % (v/v)
Bleu de coomassie R250	0,1 % (p/v)		

#### *2-2-2-5/ Détection immunologique de protéines*

##### *2-2-2-5-1/ Electrotransfert*

##### *2-2-2-5-1-1/ Gel SDS PAGE*

Après électrophorèse, le gel est immergé pendant quelques minutes dans du tampon de transfert puis placé contre une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) préalablement imbibée dans de l'eau distillée ou contre une membrane de PVDF (Immobilon, Millipore, Billerica, USA) préalablement activée dans du méthanol 100% puis réhydratée dans du tampon de transfert. Le gel et la membrane sont placés entre 4 couches de papier Whatman 3MM imbibé de tampon de transfert. Le transfert semi sec des protéines sur la membrane est effectué avec l'appareil Trans blot SD semi dry transfer cell (Biorad, Hercules, USA) sous une tension de 10 V à raison de 18 secondes par cm<sup>2</sup> de membrane pour les gels de concentration en acrylamide inférieure ou égale à 12% et de 36 secondes par cm<sup>2</sup> de membrane pour les gels de concentration en acrylamide supérieure à 15%. Les protéines transférées sont alors visualisées par coloration de la membrane avec une solution à 5% (p/v) de Rouge Ponceau S, 1% (v/v) d'acide acétique.

<u>Tampon de transfert</u>	
Méthanol	10 % (v/v)
Tris	2 mM
Glycine	15 mM

## 2-2-2-5-1-2/ Gel BN PAGE

Après électrophorèse, le gel est immergé pendant 30 minutes dans du tampon de transfert dénaturant ou natif pour une décoloration partielle du gel. Le gel est ensuite placé contre une membrane de PVDF (Immobilon, Millipore, Billerica, USA) préalablement activée dans du méthanol 100% puis réhydratée dans le même tampon de transfert que celui utilisé pour le gel. Le gel et la membrane sont placés entre 8 couches de papier Whatman 3MM imbibé de tampon de transfert. Le transfert semi sec des protéines sur la membrane est effectué avec l'appareil Trans blot SD semi dry transfer cell (Biorad, Hercules, USA) sous 10 V à raison de 18 secondes par  $\text{cm}^2$  de membrane. La membrane de PVDF est ensuite immédiatement décolorée à l'aide de la solution de décoloration (cf. 2-2-2-4). Les protéines transférées sont alors visualisées par coloration de la membrane avec une solution à 5% (p/v) de Rouge Ponceau S, 1% (v/v) d'acide acétique.

<u>Tampon de transfert dénaturant</u>		<u>Tampon de transfert natif</u>	
Méthanol	10 % (v/v)	Tricine	25 mM
Tris	25mM	Bistris	7,5 mM
Glycine	0,2 M	pH	7,0
SDS	0,1 %		

## 2-2-2-5-2/ Détection

La membrane est incubée dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante ou 16 heures à 4°C. La membrane est ensuite placée pendant une heure dans la même solution contenant l'anticorps dilué. Les différentes dilutions utilisées pour les anticorps sont décrites dans le tableau 7.

La membrane est ensuite rincée 3 fois 15 minutes dans une solution de PBS-T et incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire (anticorps anti lapin ou anti souris couplé à la peroxydase) dilué au 1/10000 dans le tampon PBS-T. La membrane est ensuite rincée 3 fois 15 minutes dans une solution de PBS-T et les protéines reconnues par l'anticorps sont révélées à l'aide du kit ECL (Amersham) ; les deux solutions de révélation sont ajoutées volume à volume et la membrane incubée pendant 1 minute. La peroxydase couplée à l'anticorps secondaire catalyse l'oxydation du luminol présent dans les solutions de révélation. Cette réaction s'accompagne d'une émission de lumière. Une autoradiographie permet la révélation du profil.

<u>Tampon PBS-T</u>		<u>Solution de blocage</u>	
NaCl	150 mM	PBS-T	1 X
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,5 mM	Lait écrémé	5 % (p/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM		
Tween 20	0,05 % (v/v)		
pH 7,4			

anticorps	dilution	type et origine	référence ou source
Ac anti-ORF138	1/5000	polyclonal ; lapin	Grelon et al, 1994
Ac anti-ORF138 purifié	1/375	polyclonal ; lapin	ce travail
Ac anti-porine de maïs	1/500	monoclonal ; souris	D. Day, UWA, Perth, Australie
Ac anti-AOX de <i>Sauromatum guttatum</i>	1/50	monoclonal ; souris	D. Day, UWA, Perth, Australie
Ac anti-CPN60 de pomme de terre	1/1000	polyclonal ; lapin	G. Bonnard, IBMP Strasbourg
Ac anti-ferrochelatase de <i>S. cerevisiae</i>	1/500	polyclonal ; lapin	E. Lessuise, IJM, Paris
Ac anti-porine de <i>S. cerevisiae</i>	1/500	monoclonal ; souris	Molecular Probes, Eugene, USA
Ac anti- $\alpha$ ATPase de <i>S. cerevisiae</i>	1/200	monoclonal ; souris	Molecular Probes, Eugene, USA
Ac anti-GFP	1/500	monoclonal ; souris	Roche, Bâle, Suisse
Ac anti-lapin	1/10000	polyclonal ; chèvre ; couplé à la peroxydase	SIGMA, St Louis, USA
Ac anti-souris	1/10000	monoclonal ; lapin ; couplé à la peroxydase	Calbiochem, Darmstadt, Allemagne

**Tableau 7**

Tableau décrivant les différents anticorps (et leurs caractéristiques) utilisés lors de ce travail

### *2-2-2-6/ Activités enzymatiques et tests colorimétriques*

#### *2-2-2-6-1/ NADH oxydase*

L'activité NADH oxydase est mesurée à 37°C comme décrit par (Osborn et al. 1972) en utilisant un spectrophotomètre Jasco V-530.

#### *2-2-2-6-2/ NADH cytochrome c oxydoréductase*

L'activité NADH cytochrome c oxydoréductase est mesurée à température ambiante comme décrit par (Douce et al. 1972) en utilisant un spectrophotomètre Jasco V-530.

#### *2-2-2-6-3/ Test KDO*

La concentration de KDO est déterminée à l'aide du test à l'acide thiobarbiturique décrit par (Karkhanis et al. 1978).

#### *2-2-2-7/ Mesures de respirations - électrode à oxygène*

Les expériences de consommation d'oxygène par les mitochondries ont été réalisées grâce à une électrode à oxygène de Clark remplie de 1 mL de tampon de réaction comme décrit par (Packer et al. 1966).

Les composés suivants : NADH (1mM), KCN (0,5mM) et nPG (0,05mM) sont ajoutés, pendant la mesure, aux concentrations finales indiquées pour moduler la consommation d'oxygène par les mitochondries.

#### Tampon de réaction

Saccharose	0,3 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
Hepes	10 mM
NaCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
BSA	0,1 % (p/v)
pH	7,0

## 2-3/ Biologie cellulaire

### 2-3-1/ Courbes de croissance d'*E. coli*

Afin d'évaluer, dans *E. coli*, l'effet de l'expression des gènes construits, des cinétiques de croissance ont été réalisées. Pour ce faire, 200 mL de milieu LB + antibiotiques sontensemencés avec 2mL de préculture de bactéries. La croissance des bactéries est évaluée par l'absorbance de la culture à 600nm ; quand celle-ci atteint 0,3, la culture est divisée en deux sous-cultures, la première est utilisée comme culture témoin non induite et une solution concentrée d'IPTG est ajouté à la deuxième jusqu'à atteindre une concentration finale de 1 mM. L'IPTG va permettre l'induction de l'expression du gène sous le contrôle du promoteur T7 du vecteur pET29a(+). La DO à 600nm est ensuite mesurée toutes les 30 minutes ou toutes les heures afin de suivre l'évolution de la croissance des bactéries dans les deux sous-cultures.

### 2-3-2/ Test de viabilité des levures après traitement à l' $H_2O_2$

Les levures issues d'une préculture en SC-U-M Raffinose à 28°C pendant 48 heures sont diluées à une concentration de 1 unité d'absorbance par mL dans un volume donné de milieu. Après les dilutions successives de la culture, 5 à 10  $\mu$ L de chaque dilution sont déposés en gouttes sur un milieu SC-U-M Raffinose gélosé contenant des concentrations variables de peroxyde d'hydrogène égales à 0, 100 et 600  $\mu$ M. Les levures sont ensuite incubées à 28 °C pendant 2 à 5 jours.

# BIBLIOGRAPHIE

- Abad, A. R., B. J. Mehrrens and S. A. Mackenzie (1995). "Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean." The Plant Cell **7**: 271-285.
- Abdelnoor, R. V., R. Yule, A. Elo, A. C. Christensen, G. Meyer-Gauen and S. A. Mackenzie (2003). "Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo and D. Kohda (2000). "Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20." Cell **100**(5): 551-60.
- Akagi, H., A. Nakamura, Y. Yokozeki-Misono, A. Inagaki, H. Takahashi, K. Mori and T. Fujimura (2004). "Positional cloning of the rice Rf-1 gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein." Theor Appl Genet **108**(8): 1449-57.
- Akagi, H., M. Sakamoto, C. Shinjyo, H. Shimada and T. Fujimura (1994). "A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial atp6 may cause male sterility." Curr Genet **25**(1): 52-8.
- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland (1998). "The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria." Nature **396**(6707): 133-40.
- Andre, C., A. Levy and V. Walbot (1992). "Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes." Trends Genet **8**(4): 128-32.
- Arimura, S., J. Yamamoto, G. P. Aida, M. Nakazono and N. Tsutsumi (2004). "Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7805-8.
- Atlan, A., P.-H. Gouyon, T. Fornial, D. Pomete and D. Couvet (1992). "Sex allocation in an hermaphroditic plant: the case of gynodioecy in *Thymus vulgaris* L." J. Evol. Biol. **5**: 189-203.
- Balk, J. and C. J. Leaver (2001). "The PET1-CMS Mitochondrial Mutation in Sunflower Is Associated with Premature Programmed Cell Death and Cytochrome c Release." Plant Cell **13**(8): 1803-18.
- Balk, J., C. J. Leaver and P. F. McCabe (1999). "Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants." FEBS Lett **463**(1-2): 151-4.
- Bannerot, H., L. Bouldard, Y. Cauderon and J. Tempé (1974). "Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*." Proc EUCARPIA Crop Sect. Cruciferae **25**: 52-54.
- Bannerot, H., L. Bouldard and Y. Chupeau (1977). "Unexpected difficulties met with the radish cytoplasm in *Brassica oleracea*." Eucarpia Cruciferae Newslett **2**: 16.
- Bechtold, N., J. Ellis and G. Pelletier (1993). "In Planta, Agrobacterium mediated gene transfer by integration of adult *Arabidopsis thaliana* plants." C. R. Acad. Sci. Paris **316**: 1194-1199.
- Behrendt, J., K. Standar, U. Lindenstrauss and T. Bruser (2004). "Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC." FEMS Microbiol Lett **234**(2): 303-8.
- Bellaoui, M., A. Martin-Canadell, G. Pelletier and F. Budar (1998). "Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids." Mol Gen Genet **257**(2): 177-85.
- Bendich, A. J. (1993). "Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure." Curr Genet **24**(4): 279-90.
- Bentolila, S., A. A. Alfonso and M. R. Hanson (2002). "A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10887-92.



- Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli and F. Di Lisa (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem **264**(3): 687-701.
- Berthold, J., M. F. Bauer, H. C. Schneider, C. Klaus, K. Dietmeier, W. Neupert and M. Brunner (1995). "The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system." Cell **81**(7): 1085-93.
- Bervillé, A., M. Gahzi, M. Chabonnier and J. F. Bonavent (1984). "Effects of methomyl and *Helminthosporium maydis* toxin on matrix volume, proton motive force, and NAD accumulation in maize (*Zea mays* L.) mitochondria." Plant Physiol **76**: 508-517.
- Binder, S. and A. Brennicke (2003). "Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1429): 181-9.
- Bomer, U., J. Rassow, N. Zufall, N. Pfanner, M. Meijer and A. C. Maarse (1996). "The preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane: evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17." J Mol Biol **262**(4): 389-95.
- Bonhomme, S., F. Budar, M. Férault and G. Pelletier (1991). "A 2.5 kb *Nco*I fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* cybrids." Curr Genet **19**: 121-127.
- Bonhomme, S., F. Budar, D. Lancelin, I. Small, M.-C. Defrance and G. Pelletier (1992). "Sequence and transcript analysis of the *Nco*2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids." Mol Gen Genet **235**: 340-348.
- Bonnet, A. (1975). "Introduction et utilisation d'une stérilité mâle cytoplasmique dans des variétés précoces européennes de radis *Raphanus sativus* L." Ann. Amélior. Plantes **25**: 381-397.
- Bonnet, A. (1977). "Breeding in France of a radish F1 hybrid obtained by use of cytoplasmic male sterility." Eucarpia Cruciferae Newslett **2**: 5.
- Bowler, C., T. Alliotte, M. Van den Bulcke, G. Bauw, J. Vandekerckhove, M. Van Montagu and D. Inze (1989). "A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3237-41.
- Braun, H. P., M. Emmermann, V. Krufft and U. K. Schmitz (1992). "The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain." Embo J **11**(9): 3219-27.
- Braun, H. P. and U. K. Schmitz (1997). "The mitochondrial processing peptidase." Int J Biochem Cell Biol **29**(8-9): 1043-5.
- Braun, H. P. and U. K. Schmitz (1999). "The protein-import apparatus of plant mitochondria." Planta **209**(3): 267-74.
- Brix, J., K. Dietmeier and N. Pfanner (1997). "Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70." J Biol Chem **272**(33): 20730-5.
- Brown, G. G., N. Formanova, H. Jin, R. Wargachuk, C. Dendy, P. Patil, M. Laforest, J. Zhang, W. Y. Cheung and B. S. Landry (2003). "The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats." Plant J **35**(2): 262-72.
- Budar, F. and G. Pelletier (2001). "Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use." C R Acad Sci III **324**(6): 543-50.
- Budar, F., P. Touzet and R. De Paepe (2003). "The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited." Genetica **117**(1): 3-16.

- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce (1994). "Mutagenic PCR." PCR Methods Appl **3**(6): S136-40.
- Callebaut, I., G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat and J. P. Mornon (1997). "Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives." Cell Mol Life Sci **53**(8): 621-45.
- Cartea, M. E., M. Migdal, A. M. Galle, G. Pelletier and P. Guerche (1998). "Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed." Plant Science **136**: 181-194.
- Chaumont, F., B. Bernier, R. Buxant, M. E. Williams, C. S. Levings, 3rd and M. Boutry (1995). "Targeting the maize T-urf13 product into tobacco mitochondria confers methomyl sensitivity to mitochondrial respiration." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1167-71.
- Chen, J. M., N. D. Rawlings, R. A. Stevens and A. J. Barrett (1998). "Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases." FEBS Lett **441**(3): 361-5.
- Cheng, M. Y., F. U. Hartl and A. L. Horwich (1990). "The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly." Nature **348**(6300): 455-8.
- Cheng, M. Y., F. U. Hartl, J. Martin, R. A. Pollock, F. Kalousek, W. Neupert, E. M. Hallberg, R. L. Hallberg and A. L. Horwich (1989). "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria." Nature **337**(6208): 620-5.
- Chétrit, P., C. Mathieu, F. Vedel, G. Pelletier and C. Primard (1985). "Mitochondrial polymorphism induced by protoplast fusion in Cruciferae." Theor Appl Genet **69**: 361-366.
- Christianson, T. R., R. Sikorski, M. Dante, J. Schero and P. Hieter (1992). "Multifunctional yeast high copy-number shuttle vectors." Gene **110**: 119-122.
- Clarke, A., R. Desikan, R. D. Hurst, J. T. Hancock and S. J. Neill (2000). "NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures." Plant J **24**(5): 667-77.
- Coleman, A. W., W. F. Thompson and L. J. Goff (1991). "Identification of the mitochondrial genome in the Chrysophyte alga *Ochromonas danica*." J. Protozoology **38**: 129-135.
- Cook, N. D. and R. Cammack (1984). "Purification and characterization of the rotenone-insensitive NADH dehydrogenase of mitochondria from *Arum maculatum*." Eur J Biochem **141**(3): 573-7.
- Cooper, P., E. Butler and K. J. Newton (1990). "Identification of a maize nuclear gene which influences the size and number of cox2 transcripts in mitochondria of perennial ++teosintes." Genetics **126**(2): 461-7.
- Couvet, D., O. Ronce and C. Gliddon (1998). "Maintenance of nucleo-cytoplasmic polymorphism in a metapopulation: the case of gynodioecy." American Naturalist **152**: 59-70.
- Couzinet, A., Z. Hérincs and A. S. Hueber (2002). "Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique." Médecine/Sciences **18**: 841-852.
- Cuguen, J., R. Wattier, P. Saumitou-laprade, D. Forcioli, M. Mörchen, H. Van-Dijk and P. Vernet (1994). "Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp *maritima*." Genetics Selection Evolution **26**: 87-101.
- Cui, X., R. P. Wise and P. S. Schnable (1996). "The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize." Science **272**: 1334-1336.
- Cummings, D. J. (1992). "Mitochondrial genomes of the ciliates." Int Rev Cytol **141**: 1-64.

- Curran, S. P., D. Leuenberger, W. Oppliger and C. M. Koehler (2002). "The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier." Embo J **21**(5): 942-53.
- Danon, A., V. Delorme, N. Mailhac and P. Gallois (2000). "Plant programmed cell death: a common way to die." Plant Physiol Biochem **38**: 647-655.
- De Jong, A. J., F. A. Hoeberichts, E. T. Yakimova, E. Maximova and E. J. Woltering (2000). "Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases." Planta **211**(5): 656-62.
- de Jong, D., F. A. Prins, D. Y. Mason, J. C. Reed, G. B. van Ommen and P. M. Kluin (1994). "Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells." Cancer Res **54**(1): 256-60.
- del Pozo, O. and E. Lam (1998). "Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens." Curr Biol **8**(20): 1129-32.
- Delannay, X. (1978). "La gynodioecie chez les angiospermes." Naturalistes Belges **59**: 223-235.
- Delledonne, M., J. Zeier, A. Marocco and C. Lamb (2001). "Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13454-9.
- Denis, M., R. Delourme, J. P. Gourret, C. Mariani and M. Renard (1993). "Expression of Engineered Nuclear Male Sterility in Brassica napus (Genetics, Morphology, Cytology, and Sensitivity to Temperature)." Plant Physiol **101**(4): 1295-1304.
- Desloire, S., H. Gherbi, W. Laloui, S. Marhadour, V. Clouet, L. Cattolico, C. Falentin, S. Giancola, M. Renard, F. Budar, I. Small, M. Caboche, R. Delourme and A. Bendahmane (2003). "Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family." EMBO Rep **4**(6): 588-594.
- Dessi, P., C. Rudhe and E. Glaser (2000). "Studies on the topology of the protein import channel in relation to the plant mitochondrial processing peptidase integrated into the cytochrome bc1 complex." Plant J **24**(5): 637-44.
- Dewey, R. E., C. S. Levings, 3rd and D. H. Timothy (1986). "Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm." Cell **44**(3): 439-49.
- Dewey, R. E., D. H. Timothy and C. S. I. I. Levings (1987). "A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 5374-5378.
- Dill, C. L., R. P. Wise and P. S. Schnable (1997). "Rf8 and Rf\* mediate unique T-urf13-transcript accumulation, revealing a conserved motif associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize." Genetics **147**(3): 1367-79.
- Dimmer, K., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert and B. Westermann (2002). "Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **13**: 847-853.
- Douce, R., E. L. Christensen and W. D. Bonner, Jr. (1972). "Preparation of intact plant mitochondria." Biochim Biophys Acta **275**(2): 148-60.
- Drew, D., D. Sjostrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier and G. von Heijne (2002). "Rapid topology mapping of Escherichia coli inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2690-5.
- Duby, G., M. Oufattole and M. Boutry (2001). "Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import." Plant J **27**(6): 539-49.

- Ducos, E., P. Touzet and M. Boutry (2001). "The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes." Plant J **26**(2): 171-80.
- Dutilleul, C., M. Garmier, G. Noctor, C. Mathieu, P. Chetrit, C. H. Foyer and R. De Paepe (2003). "Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation." Plant Cell **15**(5): 1212-1226.
- Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." Nucleic Acids Res **19**(6): 1349.
- Emmermann, M., M. Clericus, H. P. Braun, T. Mozo, L. Heins, V. Kruff and U. K. Schmitz (1994). "Molecular features, processing and import of the Rieske iron-sulfur protein from potato mitochondria." Plant Mol Biol **25**(2): 271-81.
- Emmermann, M. and U. K. Schmitz (1993). "The Cytochrome c Reductase Integrated Processing Peptidase from Potato Mitochondria Belongs to a New Class of Metalloendoproteases." Plant Physiol **103**(2): 615-620.
- Falcone, S., L. Mauro, G. de Rose, C. Paolucci, C. Sciorati, S. Ando and E. Clementi (2002). "Nitric oxide regulates oestrogen-activated signalling pathways at multiple levels through cyclic GMP-dependent recruitment of insulin receptor substrate 1." Biochem J **366**(Pt 1): 165-73.
- Farineau, J., L. Pascal and G. Pelletier (1990). "Study of respiratory and photosynthetic activities in several cytoplasmic hybrids of rapeseed with cytoplasmic male sterility." Plant Physiol Biochem **28**(3): 333-342.
- Fauron, C., M. Casper, Y. Gao and B. Moore (1995). "The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional." Trends Genet **11**(6): 228-35.
- Forde, B. G., R. J. C. Oliver and C. J. Leaver (1978). "Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasms in maize." Proc Natl Acad Sci U S A **77**: 418-422.
- Frank, S. A. (1989). "The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility." American Naturalist **133**: 345-376.
- Freire, M. A., C. Tourneur, F. Granier, J. Camonis, A. El Amrani, K. S. Browning and C. Robaglia (2000). "Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E binding protein." Plant Molecular Biology **44**(2): 129-140.
- Fujiki, Y., A. L. Hubbard, S. Fowler and P. B. Lazarow (1982). "Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum." J Cell Biol **93**(1): 97-102.
- Gagliardi, D., R. Perrin, L. Marechal-Drouard, J. M. Grienenberger and C. J. Leaver (2001). "Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3' to 5' exoribonuclease activity which proceeds unimpeded by stable secondary structures." J Biol Chem **276**: 13.
- Gakh, O., P. Cavadini and G. Isaya (2002). "Mitochondrial processing peptidases." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 63-77.
- Gandlur, S. M., L. Wei, J. Levine, J. Russell and P. Kaur (2004). "Membrane topology of the DrrB protein of the doxorubicin transporter of *Streptomyces peucetius*." J Biol Chem **279**(26): 27799-806.
- Gavel, Y. and G. von Heijne (1990). "Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides." Protein Eng **4**(1): 33-7.
- Genevois, M. L. (1929). "Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens." Revue Génétique Botanique **41**: 252-271.
- Giege, P. and A. Brennicke (1999). "RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15324-9.

- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems and R. A. Woods (1995). "Studies on the transformation of intact cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure." Yeast **11**: 355-360.
- Glaser, E. and P. Dessi (1999). "Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc<sub>1</sub> complex in plants." J Bioenerg Biomembr **31**(3): 259-74.
- Glaser, E., S. Sjoling, M. Tanudji and J. Whelan (1998). "Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation." Plant Mol Biol **38**(1-2): 311-38.
- Golombek, D. A., P. V. Agostino, S. A. Plano and G. A. Ferreyra (2004). "Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway." Neurochem Int **45**(6): 929-36.
- Gourret, J., R. Delourme and M. Renard (1992). "Expression of *ogu* cytoplasmic male sterility in cybrids of *Brassica napus*." Theor. Appl. Genet. **83**: 549-556.
- Grant, J. J. and G. J. Loake (2000). "Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance." Plant Physiol **124**(1): 21-9.
- Gray, M. W. (1992). "The endosymbiont hypothesis revisited." Int Rev Cytol **141**: 233-357.
- Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang (1999). "Mitochondrial evolution." Science **283**(5407): 1476-81.
- Grelon, M. (1995). Etude du déterminisme de la stérilité mâle cytoplasmique Ogura chez les Brassicacées. Orsay, ParisXI: 118.
- Grelon, M., F. Budar, S. Bonhomme and G. Pelletier (1994). "Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* cybrids." Mol Gen Genet **243**: 540-547.
- Grohmann, L., O. Thieck, U. Herz, W. Schroder and A. Brennicke (1994). "Translation of *nad9* mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts." Nucleic Acids Res **22**(16): 3304-11.
- Grosskopf, D. and R. M. Mulligan (1996). "Developmental- and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings." Curr Genet **29**(6): 556-63.
- Guerin, B., P. Labbe and M. Somlo (1979). "Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios." Methods Enzymol **55**: 149-59.
- Gutierrez, S., C. Lelandais, R. De Paepe, F. Vedel and P. Chétrit (1997). "A mitochondrial sub-stoichiometric *orf87-nad3-nad1* exonA co-transcription unit present in Solanaceae was amplified in the genus *Nicotiana*." Curr Genet **31**: 55-62.
- Gutierrez, S., M. Sabar, C. Lelandais, P. Chétrit, P. Diolez, H. Degand, M. Boutry, F. Vedel, Y. de Kouchkovsky and R. De Paepe (1997). "Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3436-41.
- Hachiya, N., T. Komiya, R. Alam, J. Iwahashi, M. Sakaguchi, T. Omura and K. Mihara (1994). "MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria." Embo J **13**(21): 5146-54.
- Hamel, P., W. Sakamoto, H. Wintz and G. Dujardin (1997). "Functional complementation of an *oxal1*- yeast mutation identifies an *Arabidopsis thaliana* cDNA involved in the assembly of respiratory complexes." Plant J **12**(6): 1319-27.
- Handa, H. (2003). "The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res **31**(20): 5907-16.

- Hansen, G. (2000). "Evidence for Agrobacterium-induced apoptosis in maize cells." Mol Plant Microbe Interact **13**(6): 649-57.
- Hanson, M. R. and S. Bentolila (2004). "Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development." Plant Cell **16 Suppl**: S154-69.
- Hartman, D. J., D. Dougan, N. J. Hoogenraad and P. B. Hoj (1992). "Heat shock proteins of barley mitochondria and chloroplasts. Identification of organellar hsp 10 and 12: putative chaperonin 10 homologues." FEBS Lett **305**(2): 147-50.
- Hawkins, C. J., A. G. Uren, G. Hacker, R. L. Medcalf and D. L. Vaux (1996). "Inhibition of interleukin 1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13786-90.
- He, S., A. R. Abad, S. B. Gelvin and S. A. Mackenzie (1996). "A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco." Proc Natl Acad Sci USA **93**: 11763-11768.
- Heath, M. C. (2000). "Hypersensitive response-related death." Plant Mol Biol **44**(3): 321-34.
- Heazlewood, J. L., J. Whelan and A. H. Millar (2003). "The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are F(O) components in the plant F(1)F(O) ATP synthase." FEBS Lett **540**(1-3): 201-5.
- Heins, L. and J. Soll (1998). "Chloroplast biogenesis: mixing the prokaryotic and the eukaryotic?" Curr Biol **8**(6): R215-7.
- Hell, K., J. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert and R. A. Stuart (1997). "Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space." FEBS Lett **418**(3): 367-70.
- Hell, K., J. M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert and R. A. Stuart (1998). "Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2250-5.
- Hendrick, J. P., P. E. Hodges and L. E. Rosenberg (1989). "Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(11): 4056-60.
- Hernould, M., Suharsono, E. Zabaleta, J. P. Carde, S. Litvak, A. Araya and A. Mouras (1998). "Impairment of tapetum and mitochondria in engineered male-sterile tobacco plants." Plant Mol Biol **36**(4): 499-508.
- Hernould, M., S. Suharsono, S. Litvak, A. Araya and A. Mouras (1993). "Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 2370-2374.
- Herrmann, J. M. and N. Bonnefoy (2004). "Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase." J Biol Chem **279**(4): 2507-12.
- Hoerberichts, F. A. and E. J. Woltering (2003). "Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators." Bioessays **25**(1): 47-57.
- Holden, M. J., M. Colombini and H. Sze (1985). "Channel formation in phospholipid bilayer membranes by the toxin of *Helminthosporium maydis* race T." J. Membrane Biol. **87**: 151-157.
- Hoppins, S. C. and F. E. Nargang (2004). "The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes." J Biol Chem **279**(13): 12396-405.
- Horn, R., J. Hustedt, A. Horstmeyer, J. Hahnen, K. Zetsche and W. Friedt (1996). "The CMS-associated 16 kDa protein encoded by *orfH522* in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasm of sunflower." Plant Mol Biol **30**: 523-538.

- Howad, W. and F. Kempken (1997). "Cell type-specific loss of atp6 RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 11090-5.
- Howad, W., H. V. Tang, D. R. Pring and F. Kempken (1999). "Nuclear genes from Tx CMS maintainer lines are unable to maintain atp6 RNA editing in any anther cell-type in the sorghum bicolor A3 cytoplasm." Curr Genet **36**(1-2): 62-8.
- Huang, J. and C. S. Levings, 3rd (1995). "Functional analysis of a recently originating, atypical presequence: mitochondrial import and processing of GUS fusion proteins in transgenic tobacco and yeast." Plant Mol Biol **29**(3): 519-33.
- Huang, S., K. S. Ratliff and A. Matouschek (2002). "Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential." Nat Struct Biol **9**(4): 301-7.
- Huq, S. and J. M. Palmer (1978). "Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria." FEBS Lett **95**(2): 217-20.
- Iwabuchi, M., N. Koizuka, H. Fujimoto, T. Sakai and J. Imamura (1999). "Identification and expression of the kosenia radish (*Raphanus sativus* cv. Kosenia) homologue of the Ogura radish CMS-associated gene, *orf138*." Plant Mol. Biol. **39**:183-188.
- Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Jan, P. S., K. Esser, E. Pratje and G. Michaelis (2000). "Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2." Mol Gen Genet **263**(3): 483-91.
- Jansch, L., V. Krufft, U. K. Schmitz and H. P. Braun (1996). "New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria." Plant J **9**(3): 357-68.
- Jansch, L., V. Krufft, U. K. Schmitz and H. P. Braun (1998). "Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants." J Biol Chem **273**(27): 17251-7.
- Janska, H., R. Sarria, M. Woloszynska, M. Arrieta-Montiel and S. A. Mackenzie (1998). "Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility." Plant Cell **10**(7): 1163-80.
- Joseph-Horne, T., P. M. Wood, C. K. Wood, A. L. Moore, J. Headrick and D. Hollomon (1998). "Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "take-all" fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*." J Biol Chem **273**(18): 11127-33.
- Kalousek, F., G. Isaya and L. E. Rosenberg (1992). "Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization." Embo J **11**(8): 2803-9.
- Kanazawa, A., N. Tsutsumi and A. Hirai (1994). "Reversible changes in the composition of the population of mtDNAs during dedifferentiation and regeneration in tobacco." Genetics **138**: 865-870.
- Karkhanis, Y. D., J. Y. Zeltner, J. J. Jackson and D. J. Carlo (1978). "A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria." Anal Biochem **85**(2): 595-601.
- Kaspi, C. I. and J. N. Siedow (1993). "Cross-linking of the cms-T maize mitochondrial pore-forming protein URF13 by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and its effect on URF13 sensitivity to fungal toxins." J Biol Chem **268**(8): 5828-33.

- Kato, Y., M. Sakaguchi, Y. Mori, K. Saito, T. Nakamura, E. P. Bakker, Y. Sato, S. Goshima and N. Uozumi (2001). "Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6488-93.
- Kaufman, B. A., S. M. Newman, R. L. Hallberg, C. A. Slaughter, P. S. Perlman and R. A. Butow (2000). "In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7772-7.
- Kazama, T. and K. Toriyama (2003). "A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice." FEBS Lett **544**(1-3): 99-102.
- Kempken, F., W. Howard and D. R. Pring (1998). "Mutations at specific atp6 codons which cause human mitochondrial diseases also lead to male sterility in a plant." FEBS Lett **441**(2): 159-60.
- Kennell, J. C. and D. R. Pring (1989). "Initiation and processing of *atp6*, *T-urf13* and *ORF221* transcripts from mitochondria of T cytoplasm maize." Mol Gen Genet **216**: 16-24.
- Kerscher, O., J. Holder, M. Srinivasan, R. S. Leung and R. E. Jensen (1997). "The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane." J Cell Biol **139**(7): 1663-75.
- Kiebler, M., R. Pfaller, T. Sollner, G. Griffiths, H. Horstmann, N. Pfanner and W. Neupert (1990). "Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins." Nature **348**(6302): 610-6.
- Kitashiba, H., E. Kitazawa, S. Kishitani and K. Toriyama (1999). "Partial male sterility in transgenic tobacco carrying an antisense gene for alternative oxidase under the control of a tapetum-specific promoter." Molecular Breeding **5**: 209-218.
- Kohler, R. H., R. Horn, A. Lossl and K. Zetsche (1991). "Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the atpA gene." Mol Gen Genet **227**(3): 369-76.
- Koizuka, N., R. Imai, H. Fujimoto, T. Hayakawa, Y. Kimura, J. Kohno-Murase, T. Sakai, S. Kawasaki and J. Imamura (2003). "Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosen radish." Plant J **34**(4): 407-415.
- Koltunow, A. M., J. Truettner, K. H. Cox, M. Wallroth and R. B. Goldberg (1990). "Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development." Plant Cell **2**(12): 1201-1224.
- Komiya, T., S. Rospert, C. Koehler, R. Looser, G. Schatz and K. Mihara (1998). "Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis." Embo J **17**(14): 3886-98.
- Koncz, C. and J. Schell (1986). "The promoter of TL-DNA gene 5' controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector." Mol Gen Genet **204**: 383-396.
- Korth, K. L., C. I. Kaspi, J. N. Siedow and C. S. I. Levings (1991). "URF13, a maize mitochondrial pore-forming protein, is oligomeric and has a mixed orientation in *Escherichia coli* plasma membranes." Proc Natl Acad Sci USA **88**: 10865-10869.
- Korthout, H. A., G. Berecki, W. Bruin, B. van Duijn and M. Wang (2000). "The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells." FEBS Lett **475**(2): 139-44.
- Kovermann, P., K. N. Truscott, B. Guiard, P. Rehling, N. B. Sepuri, H. Muller, R. E. Jensen, R. Wagner and N. Pfanner (2002). "Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel." Mol Cell **9**(2): 363-73.



- Kovtun, Y., W. L. Chiu, G. Tena and J. Sheen (2000). "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2940-5.
- Krishnasamy, S. and C. A. Makaroff (1993). "Characterization of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relationship with male sterility in Ogura radish." Curr. Genet. **24**: 156-163.
- Kroczyńska, B., R. Zhou, C. Wood and J. A. Miernyk (1996). "AtJ1, a mitochondrial homologue of the Escherichia coli DnaJ protein." Plant Mol Biol **31**(3): 619-29.
- Kroemer, G., P. Petit, N. Zamzami, J. L. Vayssiere and B. Mignotte (1995). "The biochemistry of programmed cell death." Faseb J **9**(13): 1277-87.
- Kubo, T., S. Nishizawa, A. Sugawara, N. Itchoda, A. Estiati and T. Mikami (2000). "The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA)." Nucleic Acids Res **28**(13): 2571-6.
- Kumashiro, T., T. Asahi and T. Komari (1988). "A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtained by fusion between *Nicotiana tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts." Plant Sci(55): 247-254.
- L'Homme, Y., R. J. Stahl, X.-Q. Li, A. Hameed and G. G. Brown (1997). "*Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the *pol* CMS-associated *orf224* gene." Curr Genet **31**: 325-335.
- Laloi, C., K. Apel and A. Danon (2004). "Reactive oxygen signalling: the latest news." Curr Opin Plant Biol **7**(3): 323-8.
- Laser, K. D. and N. R. Lersten (1972). "Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms." Bot. Rev. **38**: 425-456.
- Laver, H. K., S. J. Reynolds, F. Moneger and C. J. Leaver (1991). "Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*)." Plant J **1**(2): 185-93.
- Leclercq, P. (1969). "Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol." Ann. Amélior plantes **19**: 99-106.
- Lefebvre, A., R. Scalla and P. Pfeiffer (1990). "The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles." Plant Mol Biol **14**(4): 477-90.
- Levings, C. S. I. and I. K. Vasil (1995). The Molecular Biology of Plant Mitochondria.
- Lister, R., B. Mowday, J. Whelan and A. H. Millar (2002). "Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria." Plant J **30**(5): 555-66.
- Liu, F., X. Cui, H. T. Horner, H. Weiner and P. S. Schnable (2001). "Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize." Plant Cell **13**(5): 1063-78.
- Lockshon, D., S. G. Zweifel, L. L. Freeman-Cook, H. E. Lorimer, B. J. Brewer and W. L. Fangman (1995). "A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast." Cell **81**(6): 947-55.
- Logan, D. C. and C. J. Leaver (2000). "Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells." J Exp Bot **51**(346): 865-71.
- Lu, B. and M. R. Hanson (1996). "Fully edited and partially edited *nad9* transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria." Nucleic Acids Res **24**(7): 1369-74.
- Mackenzie, S., S. He and A. Lyznik (1994). "The Elusive Plant Mitochondrion as a Genetic System." Plant Physiol **105**(3): 775-780.

- Mackenzie, S. and L. McIntosh (1999). "Higher plant mitochondria." Plant Cell **11**(4): 571-86.
- Mackenzie, S. A. and S. Chase (1990). "Fertility restoration is associated with a loss of a portion of the mitochondrial genome in cytoplasmic male sterile common bean." Plant Cell **2**: 905-912.
- Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning - A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Margulis, L. (1970). Origin of Eucaryotic Cells, Yale University Press, New Haven.
- Marienfeld, J. R., M. Unseld, P. Brandt and A. Brennicke (1997). "Mosaic open reading frames in the Arabidopsis thaliana mitochondrial genome." Biol Chem **378**(8): 859-62.
- Martinez-Zapater, J. M., P. Gil, J. Capel and C. R. Somerville (1992). "Mutations at the Arabidopsis *CHM* locus promote rearrangements of the mitochondrial genome." The Plant Cell **4**: 889-899.
- Matthews, D. E., P. Gregory and V. E. Gracen (1979). "*Helminthosporium maydis* race T toxin induces leakage of NAD<sup>+</sup> from T cytoplasm corn mitochondria." Plant Physiol **63**: 1149-1153.
- Maxwell, D. P., Y. Wang and L. McIntosh (1999). "The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8271-6.
- McDonald, A. E., S. M. Sieger and G. C. Vanlerberghe (2002). "Methods and approaches to study plant mitochondrial alternative oxidase." Physiol Plant **116**(2): 135-143.
- Medberry, S. L., B. E. Lockhart and N. E. Olszewski (1992). "The Commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues." Plant Cell **4**(2): 185-92.
- Meeuse, B. J. D. (1975). "Thermogenic respiration in aroids." Ann. Rev. Plant Physiol. **26**: 117-126.
- Meisinger, C., M. T. Ryan, K. Hill, K. Model, J. H. Lim, A. Sickmann, H. Muller, H. E. Meyer, R. Wagner and N. Pfanner (2001). "Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors." Mol Cell Biol **21**(7): 2337-48.
- Millar, A. H., J. T. Wiskich, J. Whelan and D. A. Day (1993). "Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria." FEBS Lett **329**(3): 259-62.
- Moczko, M., K. Dietmeier, T. Sollner, B. Segui, H. F. Steger, W. Neupert and N. Pfanner (1992). "Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **310**(3): 265-8.
- Model, K., C. Meisinger, T. Prinz, N. Wiedemann, K. N. Truscott, N. Pfanner and M. T. Ryan (2001). "Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane." Nat Struct Biol **8**(4): 361-70.
- Monaghan, P., D. Robertson, T. A. Amos, M. J. Dyer, D. Y. Mason and M. F. Greaves (1992). "Ultrastructural localization of bcl-2 protein." J Histochem Cytochem **40**(12): 1819-25.
- Monéger, F., C. J. Smart and C. J. Leaver (1994). "Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene." EMBO J **13**: 8-17.
- Moore, A. L., W. D. Bonner, Jr. and P. R. Rich (1978). "The determination of the proton-motive force during cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria." Arch Biochem Biophys **186**(2): 298-306.
- Moore, A. L. and J. N. Siedow (1991). "The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria." Biochim Biophys Acta **1059**(2): 121-40.

- Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio-essays with tobacco tissue cultures." Physiol Plant **15**: 473-497.
- Murcha, M. W., R. Lister, A. Y. Ho and J. Whelan (2003). "Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis." Plant Physiol **131**(4): 1737-47.
- Neill, S. J., R. Desikan, A. Clarke, R. D. Hurst and J. T. Hancock (2002). "Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants." J Exp Bot **53**(372): 1237-47.
- Neu, R., S. Goffart, K. Wolf and B. Schafer (1998). "Relocation of urf a from the mitochondrion to the nucleus cures the mitochondrial mutator phenotype in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Gen Genet **258**(4): 389-96.
- Neupert, W. (1997). "Protein import into mitochondria." Annu Rev Biochem **66**: 863-917.
- Newton, K. J. and V. Walbot (1985). "Maize mitochondria synthesize organ-specific polypeptides." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(20): 6879-83.
- Newton, K. J., B. Winberg, K. Yamato, S. Lupold and D. B. Stern (1995). "Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene of perennial teosintes." Embo J **14**(3): 585-93.
- Nunnari, J., T. D. Fox and P. Walter (1993). "A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities." Science **262**(5142): 1997-2004.
- Oda, K., K. Yamato, E. Ohta, Y. Nakamura, M. Takemura, N. Nozato, K. Akashi, T. Kanegae, Y. Ogura, T. Kohchi and et al. (1992). "Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome." J Mol Biol **223**(1): 1-7.
- Ogura, H. (1968). "Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special references to utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds." Mem Fac Agric Kagoshima Univ **6**: 39-78.
- Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi and J. Carson (1972). "Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane." J Biol Chem **247**(12): 3962-72.
- Packer, L., K. Utsumi and M. G. Mustafa (1966). "Oscillatory states of mitochondria. 1. Electron and energy transfer pathways." Arch Biochem Biophys **117**(2): 381-393.
- Padidam, M., V. S. Reddy, R. N. Beachy and C. M. Fauquet (1999). "Molecular characterization of a plant mitochondrial chaperone GrpE." Plant Mol Biol **39**(5): 871-81.
- Paul, W., R. Hodge, S. Smartt, J. Draper and R. Scott (1992). "The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene." Plant Mol Biol **19**(4): 611-22.
- Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chétrit, R. Rémy, P. Rousselle and M. Renard (1983). "Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion." Mol Gen Genet **191**: 244-250.
- Petit, P. X., N. Zamzami, J. L. Vayssiere, B. Mignotte, G. Kroemer and M. Castedo (1997). "Implication of mitochondria in apoptosis." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 185-8.
- Petronilli, V., A. Nicolli, P. Costantini, R. Colonna and P. Bernardi (1994). "Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A." Biochim Biophys Acta **1187**(2): 255-9.
- Pfanner, N., M. G. Douglas, T. Endo, N. J. Hoogenraad, R. E. Jensen, M. Meijer, W. Neupert, G. Schatz, U. K. Schmitz and G. C. Shore (1996). "Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes." Trends Biochem Sci **21**(2): 51-2.

- Pfanner, N. and M. Meijer (1997). "The Tom and Tim machine." Curr Biol **7**(2): R100-3.
- Phreaner, C. G., M. A. Williams and R. M. Mulligan (1996). "Incomplete editing of rps12 transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria." Plant Cell **8**(1): 107-17.
- Piskur, J. (1994). "Inheritance of the yeast mitochondrial genome." Plasmid **31**(3): 229-41.
- Pontier, D., C. Balague and D. Roby (1998). "The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance." C R Acad Sci III **321**(9): 721-34.
- Prasad, T. K. and R. L. Hallberg (1989). "Identification and metabolic characterization of the *Zea mays* mitochondrial homolog of the *Escherichia coli* GroEL protein." Plant Mol Biol **12**: 609-618.
- Pratje, E., K. Esser and G. Michaelis (1994). The mitochondrial inner membrane peptidase. Signal peptidases. G. von Heijne. Austin, RG Landes: 105-112.
- Pring, D. R., W. Chen, H. V. Tang, W. Howad and F. Kempken (1998). "Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male fertility in sorghum." Current Genetics **33**: 429-436.
- Pring, D. R., H. V. Tang, W. Howad and F. Kempken (1999). "A unique two-gene gametophytic male sterility system in sorghum involving a possible role of RNA editing in fertility restoration." J Hered **90**(3): 386-93.
- Pring, D. R., H. V. Tang and K. F. Schertz (1995). Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. The Molecular Biology of Plant Mitochondria. C. S. I. Levings and I. K. Vasil, Kluwer Academic: 461-495.
- Prioli, L. M., J. Huang and C. S. I. Levings (1993). "The plant mitochondrial open reading frame *orf221* encodes a membrane bound protein." Plant Mol Biol **23**: 287-295.
- Rambaud, C., J. Dubois and J. Vasseur (1993). "Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion." Theor Appl Genet **87**: 347-352.
- Rasmusson, A. G. and I. M. Moller (1991). "Effect of calcium ions and inhibitors on internal NAD(P)H dehydrogenases in plant mitochondria." Eur J Biochem **202**(2): 617-23.
- Rehling, P., K. Model, K. Brandner, P. Kovermann, A. Sickmann, H. E. Meyer, W. Kuhlbrandt, R. Wagner, K. N. Truscott and N. Pfanner (2003). "Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase." Science **299**(5613): 1747-51.
- Rehling, P., N. Pfanner and C. Meisinger (2003). "Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour." J Mol Biol **326**(3): 639-57.
- Rep, M. and L. A. Grivell (1996). "The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis." Curr. Genet. **30**: 367-380.
- Rhoads, D., C. r. Levings and J. Siedow (1995). "URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria." J Bioenerg Biomembr **27**(4): 437-445.
- Rhoads, D. M., B. Brunner-Neuenschwander, C. S. Levings, 3rd and J. N. Siedow (1998). "Cross-linking and disulfide bond formation of introduced cysteine residues suggest a modified model for the tertiary structure of URF13 in the pore-forming oligomers." Arch Biochem Biophys **354**(1): 158-64.
- Rhoads, D. M., C. I. Kaspi, C. S. Levings, 3rd and J. N. Siedow (1994). "N,N'-dicyclohexylcarbodiimide cross-linking suggests a central core of helices II in oligomers of URF13, the pore-forming T-toxin receptor of cms-T maize mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8253-7.
- Rhoads, D. M. and L. McIntosh (1992). "Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression." Plant Cell **4**(9): 1131-1139.
- Rich, P. R. and W. D. Bonner, Jr. (1978). "An EPR analysis of cyanide-resistant mitochondria isolated from the mutant poky strain of *Neurospora crassa*." Biochim Biophys Acta **504**(3): 345-63.

- Rogers, J. S. and J. R. Edwardson (1952). "The Utilization of Cytoplasmic Male-Sterile Inbreds in the Production of Corn Hybrids." Agron. J. **44**: 8-13.
- Rospert, S., R. Looser, Y. Dubaquitte, A. Matouschek, B. S. Glick and G. Schatz (1996). "Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria." Embo J **15**(4): 764-74.
- Rudd, J. J. and V. E. Franklin-Tong (2003). "Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*." JExp Bot **54**(380): 141-8.
- Sabar, M., Y. de Kouchkovsky, S. Gutierrez, F. Vedel and R. De Paepe (1998). Mitochondrial complex I dysfunction : compatibility with survival and reproduction in cytoplasmic and nuclear male-sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. Proceedings 5th Intern. Congress Plant Mitochondria: from gene to function. I. M. Moller, P. Gardestrom, K. Glimelius and E. Glaser, Backhuys Publishers: 87-90.
- Sabar, M., D. Gagliardi, J. Balk and C. J. Leaver (2003). "ORFB is a subunit of F(1)F(O)-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower." EMBO Rep **4**(4): 1-6.
- Sakamoto, W., H. Kondo, M. Murata and F. Motoyoshi (1996). "Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator." Plant Cell **8**(8): 1377-90.
- Sakamoto, W., N. Spielwog, G. Bonnard, M. Murata and H. Wintz (2000). "Mitochondrial localization of AtOXA1, an arabidopsis homologue of yeast Oxa1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane." Plant Cell Physiol **41**(10): 1157-63.
- Sanchirico, M., A. Tzellas, T. D. Fox, H. Conrad-Webb, P. S. Periman and T. L. Mason (1995). "Relocation of the unusual VAR1 gene from the mitochondrion to the nucleus." Biochem Cell Biol **73**(11-12): 987-95.
- Sanchirico, M. E., T. D. Fox and T. L. Mason (1998). "Accumulation of mitochondrially synthesized *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p and Cox3p depends on targeting information in untranslated portions of their mRNAs." Embo J **17**(19): 5796-804.
- Sarria, R., A. Lyznik, C. E. Vallejos and S. A. Mackenzie (1998). "A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated." Plant Cell **10**: 1217-1228.
- Saumitou-Laprade, P., J. Cuguen and P. Vernet (1994). "Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict." Trends in Ecology and Evolution **9**: 431-435.
- Saur Jacobs, M. and M. J. Wade (2003). "A synthetic review of the theory of gynodioecy." Am Nat **161**(6): 837-51.
- Schagger, H., W. A. Cramer and G. von Jagow (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**(2): 220-30.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-31.
- Schmitz, U. K. and D. M. Lonsdale (1989). "A yeast mitochondrial presequence functions as a signal for targeting to plant mitochondria in vivo." Plant Cell **1**(8): 783-91.
- Schnable, P. S. and R. P. Wise (1994). "Recovery of heritable, transposon-induced, mutant alleles of the rf 2 nuclear restorer of T-cytoplasm maize." Genetics **136**(3): 1171-85.
- Schnable, P. S. and R. P. Wise (1998). "The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration." Trends in plant science **3**(5): 175-180.
- Schneider, A., M. Behrens, P. Scherer, E. Pratje, G. Michaelis and G. Schatz (1991). "Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast." Embo J **10**(2): 247-54.

- Schneider, A., W. Oppliger and P. Jenö (1994). "Purified inner membrane protease I of yeast mitochondria is a heterodimer." J Biol Chem **269**(12): 8635-8.
- Schneider, C., R. A. Newman, D. R. Sutherland, U. Asser and M. F. Greaves (1982). "A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix." J Biol Chem **257**(18): 10766-9.
- Schneider, G., S. Sjoling, E. Wallin, P. Wrede, E. Glaser and G. von Heijne (1998). "Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides." Proteins **30**(1): 49-60.
- Schuster, W., R. Hiesel, P. G. Isaac, C. J. Leaver and A. Brennicke (1986). "Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria." Nucleic Acids Res **14**(15): 5943-54.
- Scott, R. J., M. Spielman and H. G. Dickinson (2004). "Stamen structure and function." Plant Cell **16** Suppl: S46-60.
- Siedow, J. N. and A. L. Umbach (2000). "The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity." Biochim Biophys Acta **1459**(2-3): 432-9.
- Sirrenberg, C., M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert and M. Brunner (1996). "Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22." Nature **384**(6609): 582-5.
- Sluse, F. E. and W. Jarmuszkiewicz (1998). "Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role." Braz J Med Biol Res **31**(6): 733-47.
- Small, I., R. Suffolk and C. J. Leaver (1989). "Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates." Cell **58**: 69-76.
- Small, I. D., P. G. Isaac and C. J. Leaver (1987). "Stoichiometric differences in DNA molecules containing the *atpA* gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial genome diversity in maize." EMBO J **6**: 865-869.
- Small, I. D. and N. Peeters (2000). "The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins." Trends Biochem Sci **25**(2): 46-7.
- Smart, C. J., F. Monéger and C. J. Leaver (1994). "Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in Sunflower." Plant Cell **6**: 811-825.
- Smith, H. C., J. M. Gott and M. R. Hanson (1997). "A guide to RNA editing." Rna **3**(10): 1105-23.
- Sollner, T., J. Rassow, M. Wiedmann, J. Schlossmann, P. Keil, W. Neupert and N. Pfanner (1992). "Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates." Nature **355**(6355): 84-7.
- Stuart, R. A., D. M. Cyr and W. Neupert (1994). "Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation." Experientia **50**(11-12): 1002-11.
- Sun, Y. L., Y. Zhao, X. Hong and Z. H. Zhai (1999). "Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants." FEBS Lett **462**(3): 317-21.
- Suzuki, C. K., K. Suda, N. Wang and G. Schatz (1994). "Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration." Science **264**(5156): 273-6.
- Suzuki, T., S. Kawano, A. Sakai, A. Hirai and T. Kuroiwa (1996). "Variability of mitochondrial subgenomic molecules in the meristematic cells of higher plants." Genes Genet Syst **71**(5): 329-33.
- Szigyarto, C., P. Dessi, M. K. Smith, C. Knorpp, M. A. Harmey, D. A. Day, E. Glaser and J. Whelan (1998). "A matrix-located processing peptidase of plant mitochondria." Plant Mol Biol **36**(1): 171-81.
- Takenaka, M., J. Neuwirt and A. Brennicke (2004). "Complex cis-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria." Nucleic Acids Res **32**(14): 4137-44.

- Tang, H. V., R. Chang and D. R. Pring (1998). "Cosegregation of single genes associated with fertility restoration and transcript processing of sorghum mitochondrial orf107 and urf209." Genetics **150**(1): 383-91.
- Tang, H. V., D. R. Pring, L. C. Shaw, R. A. Salazar, F. R. Muza, B. Yan and K. F. Schertz (1996). "Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum." The Plant Journal **10**(1): 123-133.
- Thomas, S. G. and V. E. Franklin-Tong (2004). "Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen." Nature **429**(6989): 305-9.
- Tian, R., G. Y. Zhang, C. H. Yan and Y. R. Dai (2000). "Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells." FEBS Lett **474**(1): 11-5.
- Truscott, K. N., P. Kovermann, A. Geissler, A. Merlin, M. Meijer, A. J. Driessen, J. Rassow, N. Pfanner and R. Wagner (2001). "A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23." Nat Struct Biol **8**(12): 1074-82.
- Umbach, A. L. and J. N. Siedow (1993). "Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity." Plant Physiol **103**(3): 845-854.
- Umbach, A. L. and J. N. Siedow (1996). "The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that alpha-keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal." J Biol Chem **271**(40): 25019-26.
- Umbach, A. L. and J. N. Siedow (2000). "The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme." Arch Biochem Biophys **378**(2): 234-45.
- Umbach, A. L., J. T. Wiskich and J. N. Siedow (1994). "Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria." FEBS Lett **348**(2): 181-4.
- Unsold, M., J. R. Marienfeld, P. Brandt and A. Brennicke (1997). "The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides." Nat Genet **15**(1): 57-61.
- Uren, A. G., K. O'Rourke, L. A. Aravind, M. T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin and V. M. Dixit (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." Mol Cell **6**(4): 961-7.
- van Dijl, J. M., E. Kutejova, K. Suda, D. Perecko, G. Schatz and C. K. Suzuki (1998). "The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: roles in proteolysis and respiration-dependent growth." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10584-9.
- Van Dyck, L., D. A. Pearce and F. Sherman (1994). "PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **269**(1): 238-42.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh (1992). "Alternative oxidase: from gene to function." Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **48**: 703-734.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh (1996). "Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria." Plant Physiol **111**(2): 589-595.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh (1997). "ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 703-734.
- Vedel, F., P. Chétrit, C. Mathieu, G. Pelletier and C. Primard (1986). "Several different mitochondrial DNA regions are involved in intergenomic recombination in *Brassica napus* cybrid plants." Curr Genet **11**: 17-24.

- Vedel, F., C. Mathieu, P. Chétrit, G. Pelletier and C. Primard (1987). "Mitochondrial DNA variation in cytoplasmic male sterile somatic hybrids of *Brassica napus*." Plant Physiol Biochem **25**: 249-257.
- Vedel, F., M. Pla, V. Vitart, S. Guttierres, P. Chétrit and R. De Paepe (1994). "Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants." Plant Physiol. Biochem. **32**: 601-618.
- Verniquet, F., J. Gaillard, M. Neuburger and R. Douce (1991). "Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide." Biochem J **276 ( Pt 3)**: 643-8.
- Vial, S., H. Lu, S. Allen, P. Savory, D. Thornton, J. Sheehan and K. Tokatlidis (2002). "Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone." J Biol Chem **277(39)**: 36100-8.
- Voos, W., B. D. Gambill, B. Guiard, N. Pfanner and E. A. Craig (1993). "Presequence and mature part of preproteins strongly influence the dependence of mitochondrial protein import on heat shock protein 70 in the matrix." J Cell Biol **123(1)**: 119-26.
- Vranova, E., D. Inze and F. Van Breusegem (2002). "Signal transduction during oxidative stress." J Exp Bot **53(372)**: 1227-36.
- Wagner, A. M. and A. L. Moore (1997). "Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism." Biosci Rep **17(3)**: 319-33.
- Watts, F. Z., A. J. Walters and A. L. Moore (1992). "Characterisation of PHSP1, a cDNA encoding a mitochondrial HSP70 from *Pisum sativum*." Plant Mol Biol **18(1)**: 23-32.
- Weigel, D. and J. Glazebrook (2001). Arabidopsis: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Werhahn, W., A. Niemeyer, L. Jansch, V. Kruft, U. K. Schmitz and H. Braun (2001). "Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from Arabidopsis. Identification of multiple forms of TOM20." Plant Physiol **125(2)**: 943-54.
- Westermann, B. and W. Neupert (2000). "Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **16**: 1421-1427.
- Wiedemann, N., A. E. Frazier and N. Pfanner (2004). "The protein import machinery of mitochondria." J Biol Chem **279(15)**: 14473-6.
- Williams, M. A., W. A. Tallakson, C. G. Phreaner and R. M. Mulligan (1998). "Editing and translation of ribosomal protein S13 transcripts: unedited translation products are not detectable in maize mitochondria." Curr Genet **34(3)**: 221-6.
- Wintz, H., H. C. Chen, C. A. Sutton, C. A. Conley, A. Cobb, D. Ruth and M. R. Hanson (1995). "Expression of the CMS-associated urfS sequence in transgenic petunia and tobacco." Plant Mol Biol **28(1)**: 83-92.
- Wise, R. P., C. R. Bronson, P. S. Schnable and H. T. Horner (1999). "The genetics, pathology and molecular biology of T-cytoplasm male sterility in maize." Advances in Agronomy **65**: 79-131.
- Wise, R. P., C. L. Dill and P. S. Schnable (1996). "Mutator-induced mutations of the rfl nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of T-urf13 mitochondrial transcripts." Genetics **143(3)**: 1383-94.
- Wise, R. P., D. R. Pring and B. G. Gengenbach (1987). "Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T)-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame." Proc Natl Acad Sci USA **84**: 2858-2862.
- Wolstenholme, D. R. and C. M. R. Fauron (1995). Mitochondrial genome organization. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants: The Molecular Biology of Plant Mitochondria. Boston, Kluwer Academic Publishers. **3**: 1-59.



- Worstell, J. V., H. J. Kidd and K. F. Schertz (1984). "Relationships among male-sterility inducing cytoplasm of sorghum." Crop Sci **24**: 186-189.
- Wu, H. M. and A. Y. Cheun (2000). "Programmed cell death in plant reproduction." Plant Mol Biol **44**(3): 267-81.
- Xu, G.-W., Y.-X. Cui, K. F. Schertz and G. E. Hart (1995). "Isolation of mitochondrial DNA sequences that distinguish male-sterility-inducing cytoplasm in *Sorghum bicolor* (L.) Moench." Theor Appl Genet **90**: 1180-1187.
- Xu, Y. and M. R. Hanson (2000). "Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia." Plant Physiol **122**(4): 1323-33.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (2001). "Intra-and Inter-specific variations in the mitochondrial gene orf138 of Ogura-type male sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*." Theor. Appl. Genet. **103**: 725-732.
- Yesodi, V., S. Izhar, D. Gidoni, Y. Tabib and N. Firon (1995). "Involvement of two different urf-s related mitochondrial sequences in the molecular evolution of the CMS-specific S-Pcf locus in petunia." Mol Gen Genet **248**(5): 540-6.
- Yui, R., S. Iketani, T. Mikami and T. Kubo (2003). "Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit in anther tapetum causes male sterility." Plant J **34**(1): 57-66.
- Zhang, X. P. and E. Glaser (2002). "Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone." Trends Plant Sci **7**(1): 14-21.
- Zweifel, S. G. and W. L. Fangman (1991). "A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA." Genetics **128**(2): 241-9.

# ANNEXES

# **ANNEXE 1**

## Annexe 1

### Stratégie de construction des vecteurs A2, A3 et A4.

#### Construction du plasmide A2

Une digestion *Bam*HI-*Xho*I du vecteur A1 permet d'obtenir un fragment de 1186 pb contenant le gène *orf138-gfp*. Un clonage de ce fragment en phase avec l'ATG du vecteur d'expression pET29a(+) conduit à l'obtention du vecteur A2.

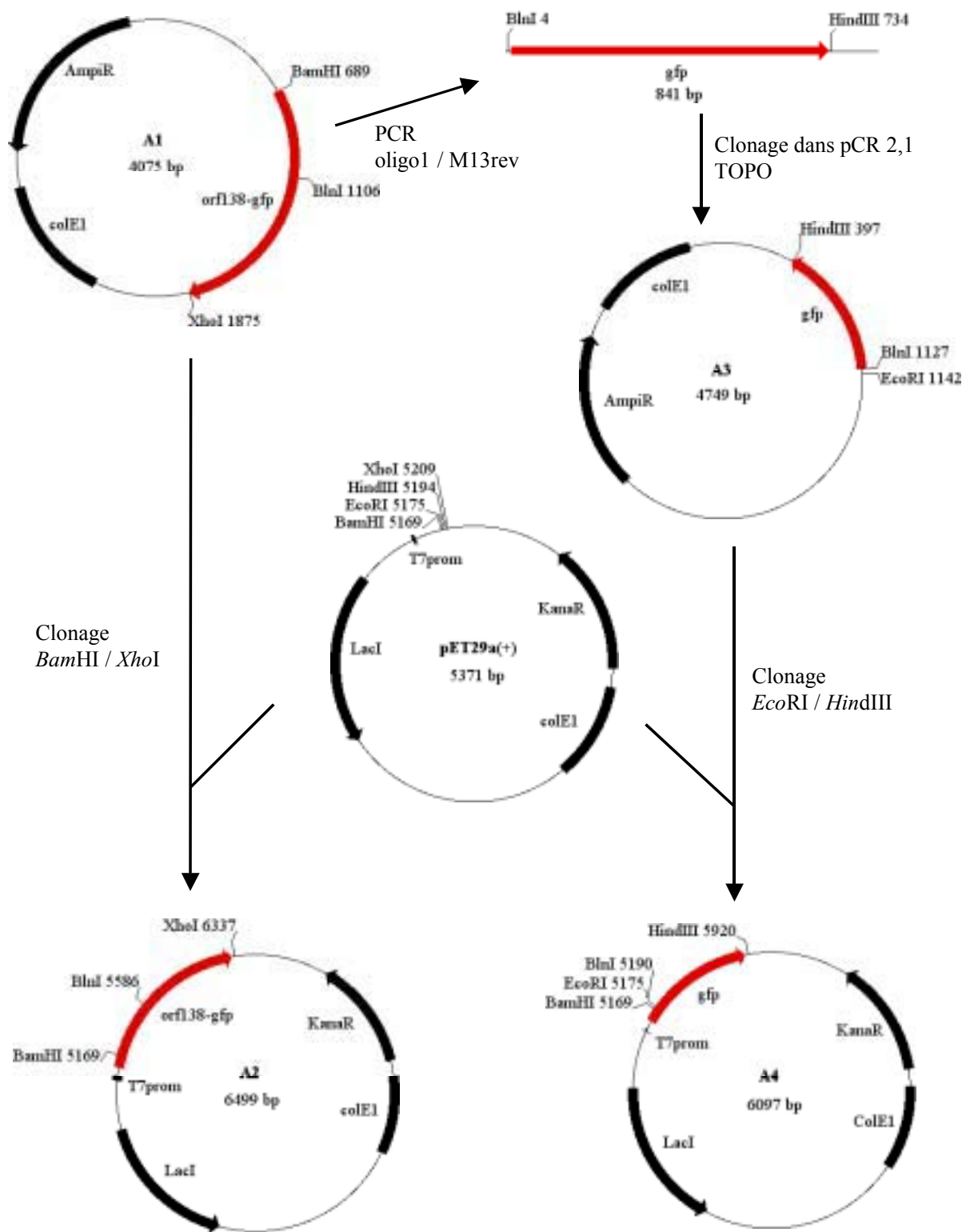
#### Construction du plasmide A3

Une amplification à l'aide des amorces oligo1 et M13Rev sur le plasmide A1 permet l'obtention d'un fragment de 841 pb contenant le gène *gfp*. Son clonage dans le vecteur pCR2.1 TOPO permet d'obtenir le vecteur A3 après vérification de la séquence du fragment inséré.

#### Construction du plasmide A4

Une digestion *Eco*RI-*Hind*III du vecteur A3 permet d'obtenir un fragment de 745 pb contenant le gène *gfp*. Un clonage de ce fragment en phase avec l'ATG du vecteur d'expression pET29a(+) conduit à l'obtention du vecteur A4.

Les vecteurs A2 et A4 permettent l'expression des gènes *orf138-gfp* et *gfp* sous le contrôle du promoteur T7.

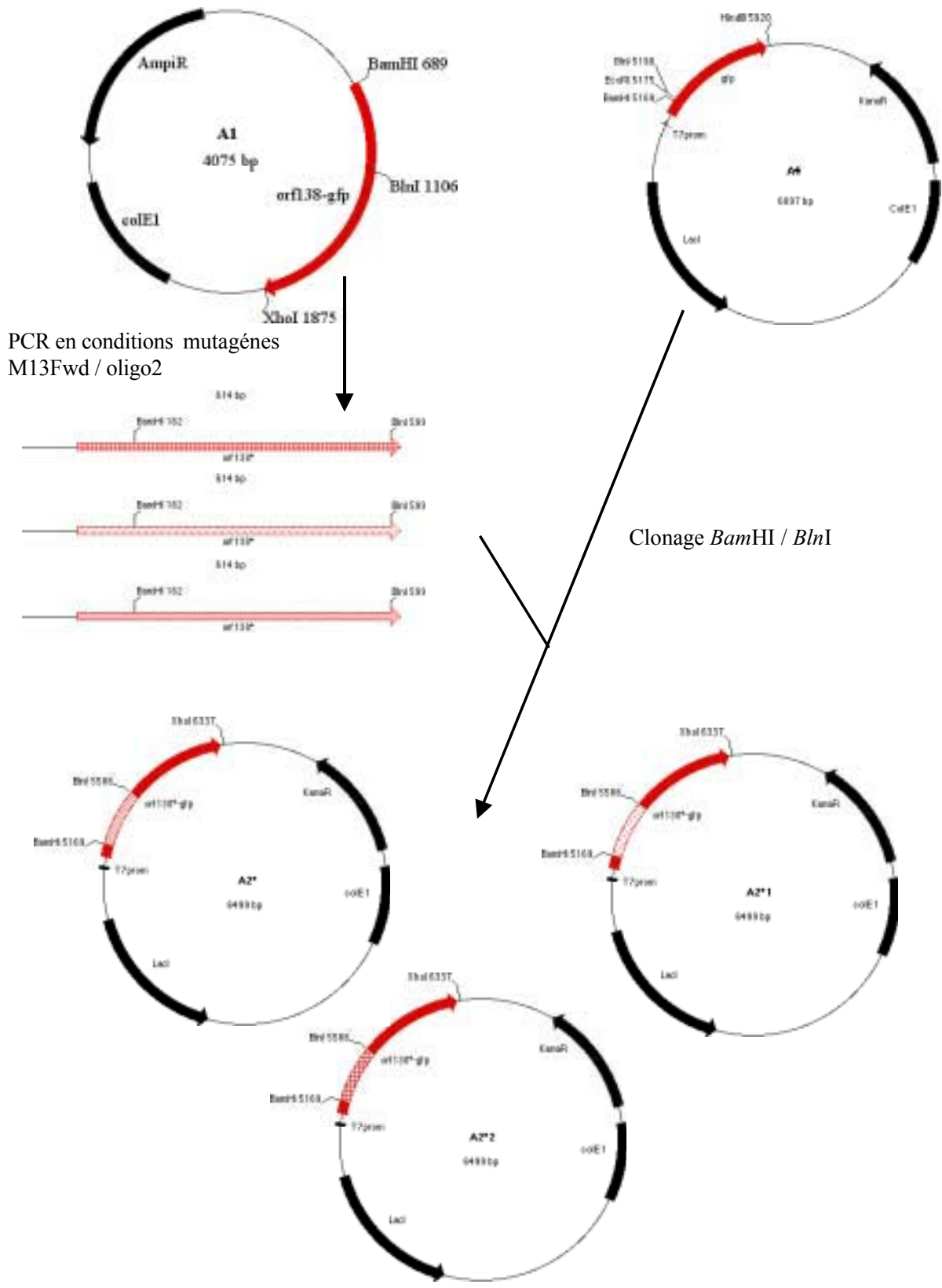


## **ANNEXE 2**

## Annexe 2

### Stratégie de construction des fragments issus de la PCR mutagène.

Une amplification en conditions mutagènes à l'aide des amorces oligo2 et M13Fwd sur le plasmide A1 permet l'obtention d'une population de fragments de 614 pb contenant chacun un gène *orf138* où des mutations ont été introduites aléatoirement. Un clonage de ces fragments en phase avec l'ATG du vecteur d'expression A4 à l'aide des enzymes *Bam*HI et *Bln*I conduit à l'obtention d'une population de plasmide permettant l'expression des gènes *orf138-gfp* sous le contrôle du promoteur T7.



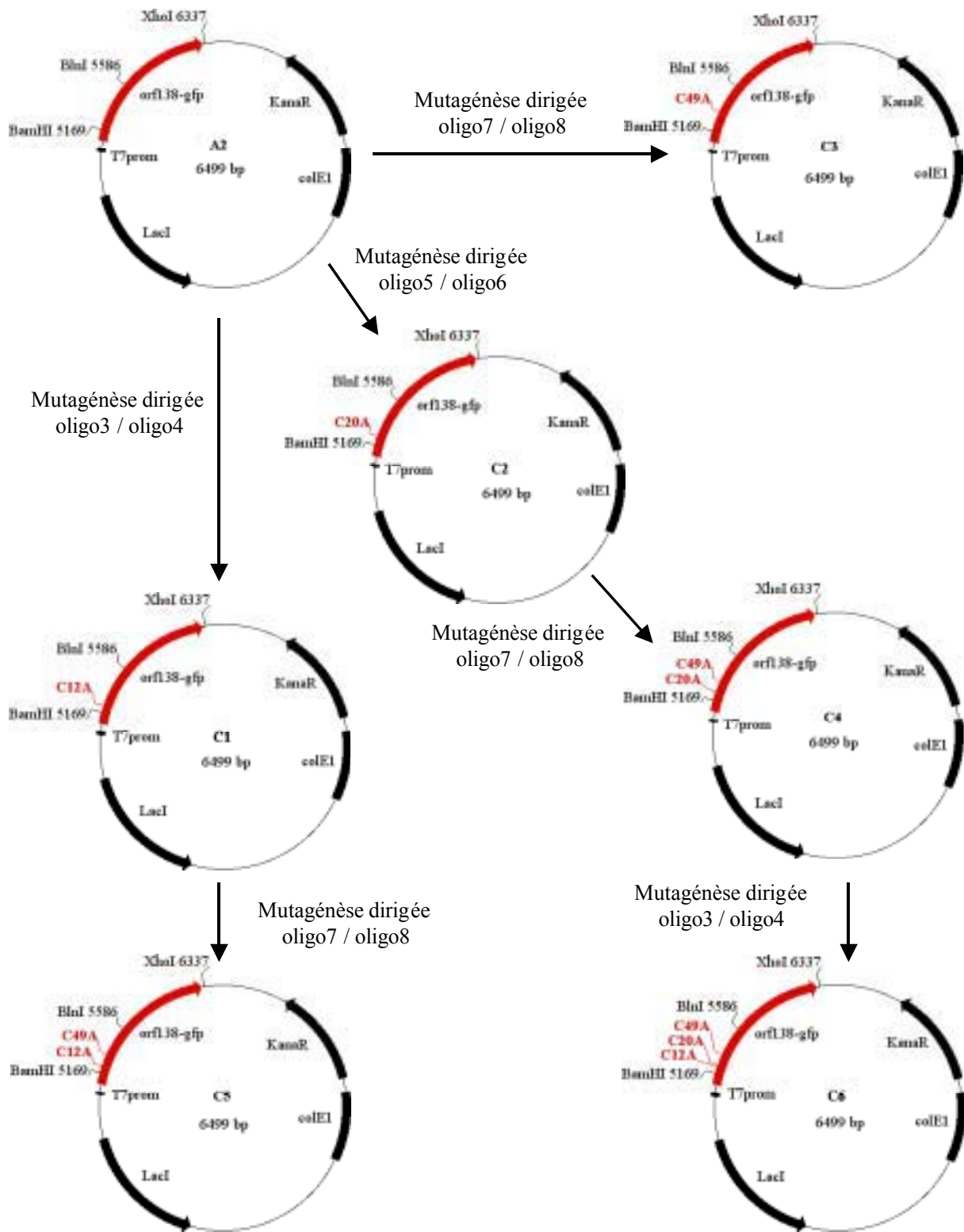


## **ANNEXE 3**

## Annexe 3

### Stratégie d'obtention des mutants cystéines de l'*orf138*.

Les couples d'amorces oligo3/oligo4, oligo5/oligo6 et oligo7/oligo8 ont été utilisés pour produire les mutations désirées sur les codons cystéines situés en position 12, 20 et 49 à l'aide du kit QuickChange. Les plasmides C1, C2, C3, C4, C5 et C6 permettent l'expression des protéines ORF138-C12A-GFP, ORF138-C20A-GFP, ORF138-C49A-GFP, ORF138-C20A-C49A-GFP, ORF138-C12A-C49A-GFP et ORF138-C12A-C20A-C49A-GFP sous le contrôle du promoteur T7.



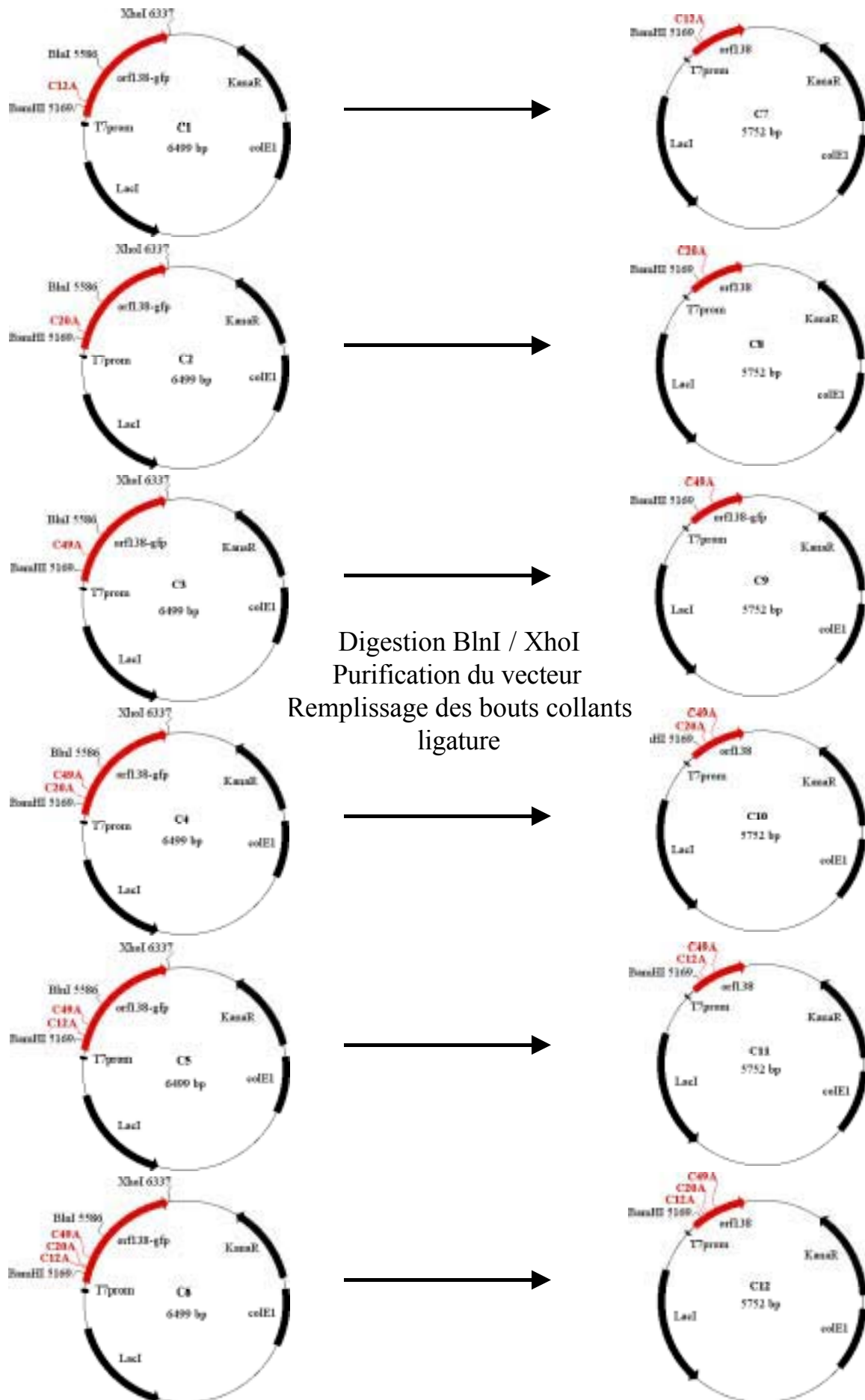
## **ANNEXE 4**

## Annexe 4

### Stratégie d'élimination du gène *gfp* dans les plasmides C1 à C6.

Une digestion à l'aide des enzymes *BlnI* et *XhoI* des vecteurs permet l'obtention de fragments de 5748 pb. Après purification et remplissage des bouts collants, une ligation permet d'obtenir les vecteurs C7 à C12. Ces vecteurs contiennent les gènes *orf138* correspondants aux vecteurs C1 à C6 où les codons cystéines ont été substitués.





## **ANNEXE 5**



## Annexe 5

### Stratégie de construction des vecteurs B2, B3 et B4.

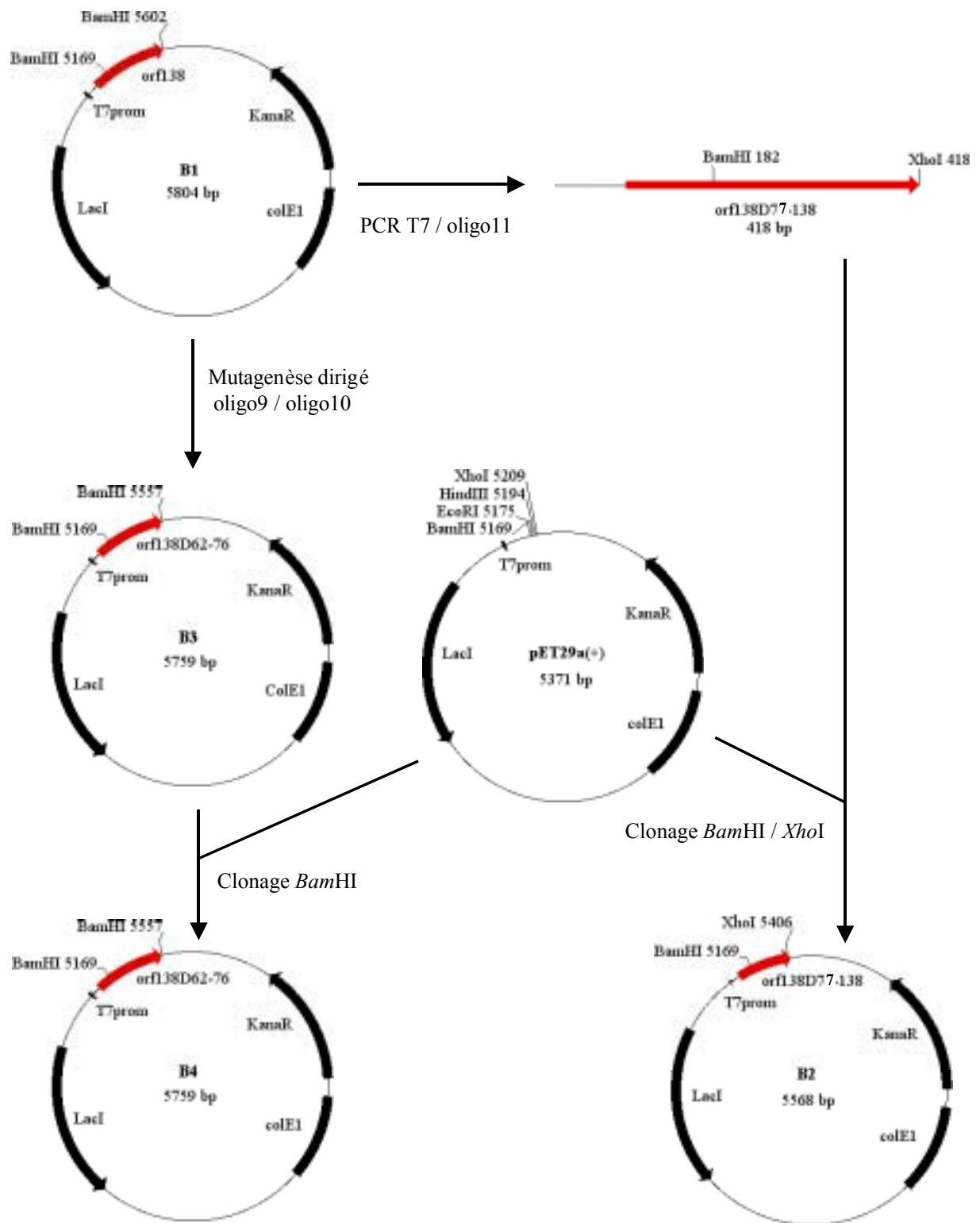
#### Construction du plasmide B2

Une amplification à l'aide des amorces oligo11 et T7 sur le plasmide B1 permet l'obtention d'un fragment de 418 pb contenant le gène *orf138Δ77-138*. Un clonage de ce fragment en phase avec l'ATG du vecteur d'expression pET29a(+) conduit à l'obtention du vecteur B2 après vérification de la séquence du fragment inséré.

#### Construction du plasmide B4

Le couple d'amorces oligo9/oligo10 a été utilisé pour produire le gène *orf138Δ62-76* à l'aide du kit QuickChange (B3). Le fragment *Bam*HI du vecteur B3 (388 pb) est alors cloné en phase avec l'ATG du vecteur d'expression pET29a(+) pour obtenir le vecteur B4 après vérification de la séquence du fragment inséré.

Les vecteurs B2 et B4 permettent l'expression des gènes *orf138Δ77-138* et *orf138Δ62-76* sous le contrôle du promoteur T7.



## **ANNEXE 6**

## Annexe 6 (1ere partie)

### Stratégie de construction du vecteur D8.

#### Construction du plasmide D4

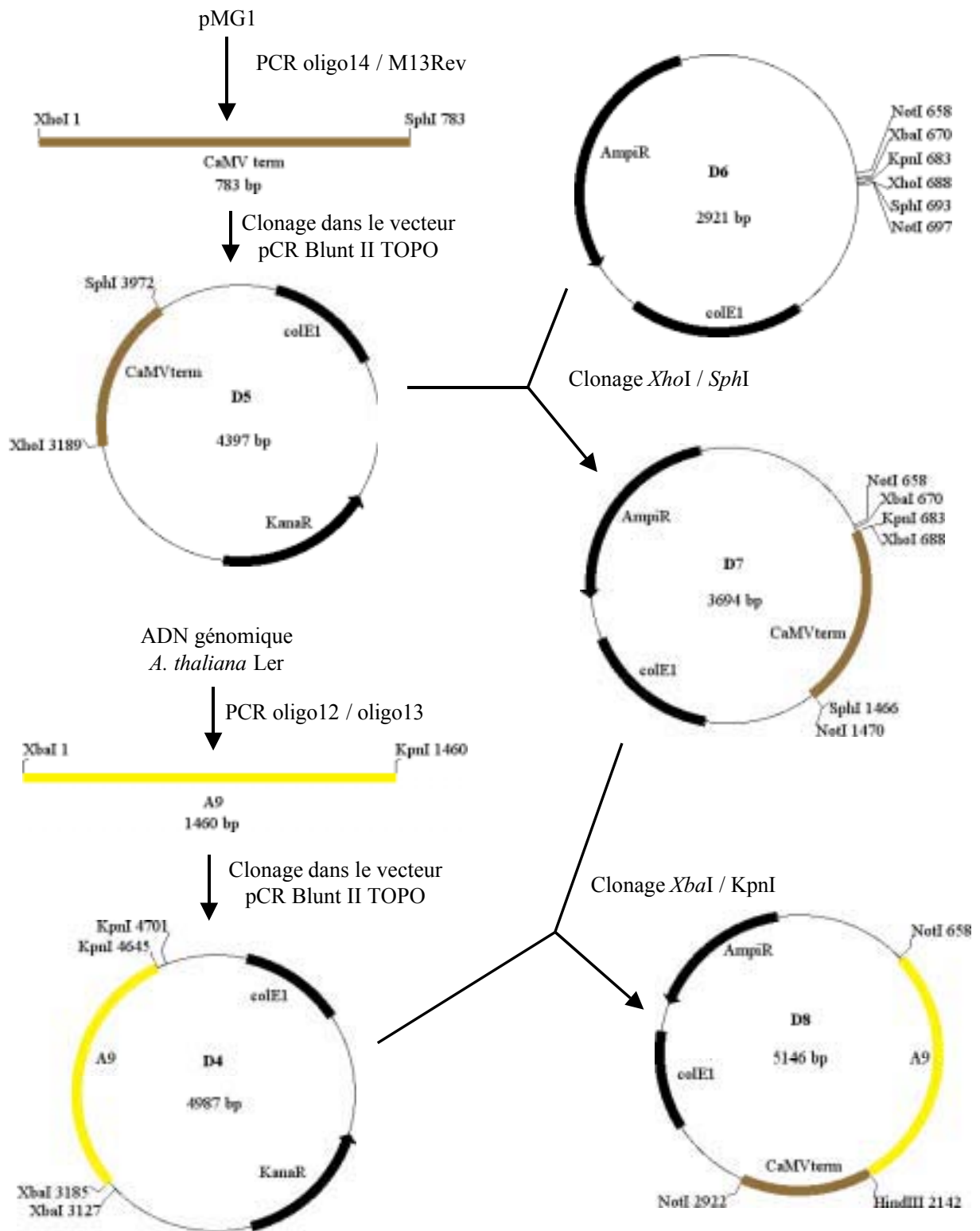
Une amplification à l'aide des amorces oligo12 et oligo13 sur de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* Ler permet l'obtention d'un fragment de 1460 pb contenant le promoteur A9. Son clonage dans le vecteur pCR Blunt II TOPO permet d'obtenir le vecteur D4 après vérification de la séquence du fragment inséré.

#### Construction du plasmide D7

Une amplification à l'aide des amorces oligo14 et M13Rev sur le plasmide pMG1 permet l'obtention d'un fragment de 783 pb contenant le terminateur du CaMV. Son clonage dans le vecteur pCR Blunt II TOPO permet d'obtenir le vecteur D5 après vérification de la séquence du fragment inséré. Une digestion *XhoI-SphI* du vecteur D5 et le clonage du fragment ainsi généré dans le vecteur D6 permet d'obtenir le vecteur D7.

#### Construction du plasmide D8

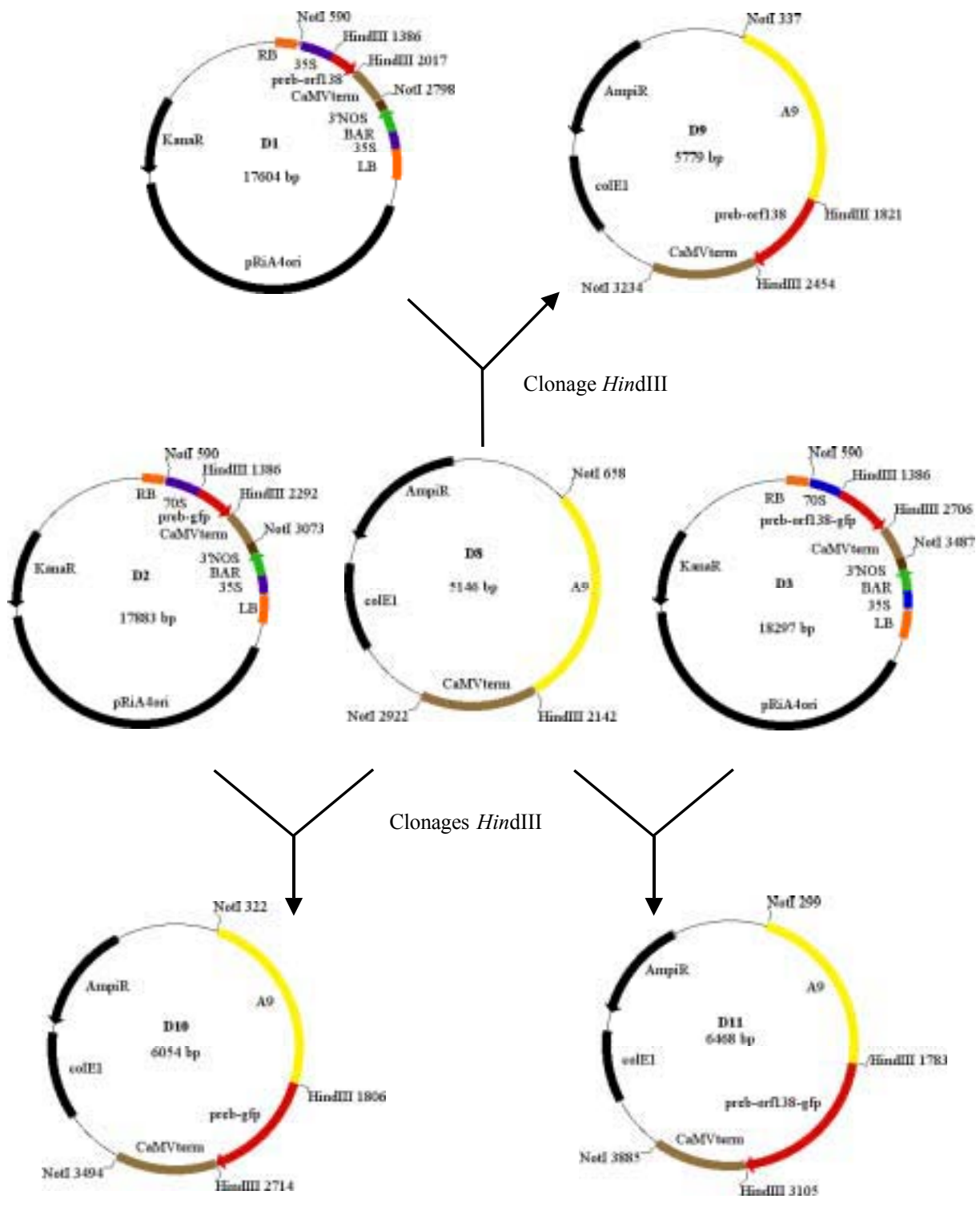
Un clonage *XbaI/KpnI* du fragment de 1460 pb du vecteur D4 dans le vecteur D7 conduit au vecteur D8. Ce plasmide contient un site multiple de clonage entre le promoteur A9 et le terminateur du CaMV. Cette séquence promoteur-terminateur est entourée de 2 sites *NotI* permettant le clonage des constructions "promoteur-gène-terminateur" dans le vecteur binaire pEC2.



## Annexe 6 (2eme partie)

### Stratégie de construction des vecteurs D9, D10 et D11.

Une digestion *Hind*III des plasmides D1, D2 et D3 permet d'obtenir des fragments de 631, 906 et 1320 pb contenant les gènes *pre $\beta$ -orf138*, *pre $\beta$ -gfp* et *pre $\beta$ -orf138-gfp*. Clonés dans le vecteur D8 ils permettent d'obtenir les plasmides D9, D10 et D11

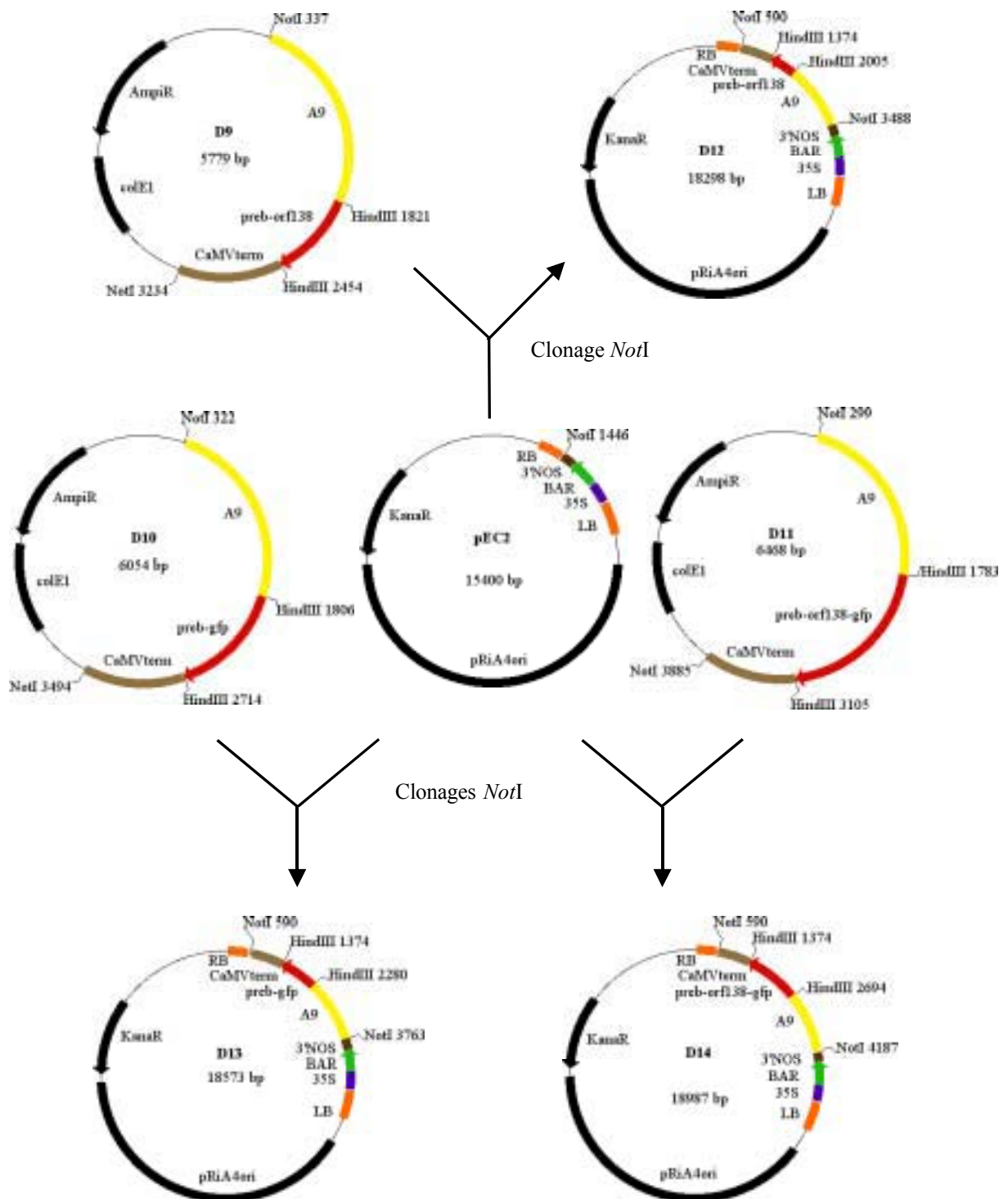


## Annexe 6 (3eme partie)

### Stratégie de construction des vecteurs D12, D13 et D14.

Une digestion *NotI* des plasmides D9, D10 et D11 permet d'obtenir des fragments de 2897, 3172 et 3586 pb contenant les séquences promoteur A9/pre $\beta$ -*orf138*/terminateur du CaMV, promoteur A9/pre $\beta$ -*gfp*/terminateur du CaMV et promoteur A9/pre $\beta$ -*orf138-gfp*/terminateur du CaMV. Clonés dans le vecteur binaire pEC2, ils permettent d'obtenir les plasmides D12, D13 et D14.





## **ANNEXE 7**

Article soumis au journal Plant Physiology le 1<sup>er</sup> octobre 2004

(ID :PLANTPHYSIOL/2004/054254)

Running head: Analysis of a CMS protein in various heterologous systems

Corresponding author:

F. Budar

Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, Route de Saint-Cyr, 78026  
Versailles cedex, France.

Tel: (33) (0)1 30 83 31 80

Fax: (33) (0)1 30 83 33 19

Email: [budar@versailles.inra.fr](mailto:budar@versailles.inra.fr)

Research area: Cell Biology

Production of a cytoplasmic male sterility-associated protein affects growth in *Escherichia coli* and modifies mitochondrial morphology in yeast and plant cells

Yann DUROC\*, Catherine GAILLARD\*, Sophie HIARD, Corinne TINCHANT, Marie-Christine DEFRANCE, Richard BERTHOMÉ, Georges PELLETIER and Françoise BUDAR.

Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.

\*These authors contributed equally to this work

This work was supported by a grant awarded to C. Gaillard by the French "*Association pour la Promotion des Recherches sur les Oleagineux*" (PROMOSOL). Y. Duroc was supported by the "Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains" (CETIOM).

Correponding author: Françoise BUDAR, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.

Tel: (33) 01 30 83 31 80

Fax: (33) 01 30 83 33 19

E-mail: budar@versailles.inra.fr

## **Abstract**

ORF138, which is responsible for Ogura-type cytoplasmic male sterility (cms) in radish and *Brassica*, is present as a homooligomer in the inner membrane of plant mitochondria. Plant cells producing ORF138 appear normal, except for those undergoing male gametogenesis. In contrast, the production of this protein in *E. coli* severely affects growth. ORF138 is also associated with membranes and forms oligomers in bacteria. Our results strongly suggest that the toxic effect of ORF138 on the growth of *E. coli* is not due to inhibition of respiration. Studies with bacteria producing deletion mutant forms of ORF138 indicated that certain structural features of the protein are required for the complete inhibition of bacterial growth. In contrast, the production and targeting of the ORF138 protein to mitochondria did not prevent the growth of yeast cells on fermentable or nonfermentable media. However, it did modify the cytological appearance of mitochondria in both yeast and plant cells.

## Introduction

Cytoplasmic male sterility (cms) is a phenomenon specific to plant reproduction that has been extensively exploited for hybrid seed production. It can occur in natural populations and reflects a conflict between the maternally inherited mitochondrial genome, which induces male sterility without affecting the overall fitness of the plant, and the nuclear genome, which restores male fertility (Werren and Beukeboom 1998; Frank 2000; Budar et al. 2003). There are probably few mechanisms by which a constitutively expressed mitochondrial gene could impair male reproductive function without affecting vegetative development or female gametogenesis. Thus, unraveling the mechanism of a natural cms system should provide insight into the role played by the mitochondria in male gametogenesis in plants. However, before this can be achieved, we need to improve our knowledge of the structure of the cms-associated protein, its interaction with mitochondrial membranes and the structure-function relationship of this protein.

A number of mitochondrial genes have been shown to be associated with cms in the last 15 years, but very few of the proteins encoded by these genes have been studied experimentally (for recent reviews, see (Schnable and Wise 1998; Kempken and Pring 1999; Hanson and Bentolila 2004)). T-URF13, the product of the *T-urf13* gene responsible for the cms and fungal toxin sensitivity associated with the Texas cytoplasm in maize, has been studied in most detail (reviewed in (Rhoads et al. 1995; Wise et al. 1999)). Associated sensitivity to fungal toxins and to methomyl is a feature specific to the T-cytoplasm, and has been used in investigations in heterologous organisms such as *E. coli*, yeast and insect cells (Dewey et al. 1988; Glab et al. 1990; Korth et al. 1991; Korth and Levings 1993). Most of what is known about the biochemistry of T-URF13 and its interaction with membranes was obtained from studies in bacteria (reviewed in (Wise et al. 1999)). Sensitivity to Texas-cytoplasm-specific toxins was also conferred to yeast cells by production of a mitochondrion-targeted T-URF13 protein (Glab et al. 1990; Huang et al. 1990). However, the mechanisms underlying cms remain unclear.

There are currently two main hypotheses concerning the mechanism of cms in plants. In the first, an unknown 'X factor' present only in the anthers interacts with the cms gene product (Flavell 1974). This interaction triggers a cascade of events resulting in the abortion of microspores. Alternatively, the cms gene product may interfere with mitochondrial physiology, decreasing the efficiency of respiration or ATP production. This deficiency

would prevent the anther from reaching an energy supply threshold, resulting in the inhibition of microspore development (Levings 1993). Both mechanisms have been proposed for the maize Texas cms. It has also been suggested that premature programmed cell death (PDC) of tapetum cells is involved in the PET1 cms mechanism in sunflower (Balk and Leaver 2001). This mechanism may work in conjunction with previously suggested mechanisms.

So far, there is no evidence for a common physiological mechanism of cms in all systems. In general there is no similarity between mitochondrial genes associated with cms, but similarities have been found between the *pol* and *nap* cms-associated open reading frames (orf) in *Brassica* (L'Homme et al. 1997) and between the cms-associated *orf79* in rice and *orf107* in *Sorghum* (Tang et al. 1996). No examples of toxin sensitivity associated with cms other than that of the T-cytoplasm have been reported and very few of the predicted protein products have been unambiguously detected and localized.

A mitochondrial gene, *orf138*, encoding a protein associated with mitochondrial membranes (Grelon et al. 1994) has been shown to be responsible for Ogura cms in *Brassica* and *Raphanus* species (Bonhomme et al. 1992; Krishnasamy and Makaroff 1993). It is present in natural populations of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) in Asia and Europe (Yamagishi and Terachi 1997); Giancola, Rao et al. in preparation). As in most cms systems studied, the protein thought to be responsible for the sterile phenotype is present in all organs of sterile plants, including hypocotyls, leaves, roots and buds (Grelon et al. 1994), but no morphological or respiratory defect is detected in the vegetative tissues of these plants (Farineau et al. 1990). This feature is common to several cms systems and accounts for the difficulties encountered in studies of the mechanism of cms (Kempken and Pring 1999). Biochemical and structural analyses of the cms proteins are required. These studies would be facilitated by the setting up of heterologous systems as these systems may provide valuable information for subsequent structural and physiological analyses of cms in male reproductive organs. We constructed heterologous systems, in which the structure and effects of ORF138 could be studied easily, to enable us to develop tools for biochemical and physiological studies. We present here our results concerning ORF138 protein production in *E. coli* and *S. cerevisiae* and the ectopic production of this protein in plant cells. Our results provide the first evidence that structural features of ORF138 may be responsible for its effect, at least in *E. coli*. Our observations also suggest that ORF138 modifies mitochondrial morphology.



## RESULTS

### **The ORF138 polypeptide spontaneously oligomerizes *in vitro* and forms oligomers associated with the inner mitochondrial membrane**

We have shown that ORF138 is associated with the membrane fraction of sterile plant mitochondria even after alkaline carbonate treatment (Grelon et al. 1994). We purified mitoplasts from the outer membrane fraction, to localize the protein more accurately. We applied an osmotic shock to mitochondria from sterile plants and separated mitoplasts from the outer membrane fraction by centrifugation on a sucrose step gradient. We assessed the enrichment of the inner or outer membrane in each collected fraction by measuring the proportions of antimycin A sensitive (inner membrane) or insensitive (outer membrane) NADH cytochrome c oxidoreductase activities (Fig. 1A, table). Western blot analysis of the fractions revealed that the fraction with the highest amounts of antimycin A sensitive activity was substantially enriched in ORF138 (Fig. 1A). Thus, ORF138, like maize T-URF13, is associated with the inner mitochondrial membrane (Rhoads et al. 1995).

We previously reported (Grelon et al. 1994) that anti-ORF138 antiserum detects not only the monomeric form of ORF138 (theoretical molecular mass 19kD, apparent molecular mass 22kD), but also proteins with apparent molecular masses of 35 kDa and 52 kDa. We unambiguously identified these additional signals by synthesizing ORF138 *in vitro*, using a cell-free transcription/translation system, in the presence of <sup>35</sup>S-labeled methionine. SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 1B) showed that the translation product underwent spontaneous oligomerization in the absence of reducing agents: dimers, and in some cases trimers (data not shown), were detected. Quantitative analysis with a phosphorimager showed that monomers accounted for about 75% of the total signal, the rest corresponding to dimers. However, in the presence of β-mercaptoethanol, we detected only monomeric ORF138 (Fig. 1B). Quantitative analysis showed that the signal for the band detected in the presence of reducing agent was equivalent to the sum of the signals from the two bands observed in the absence of reducing agent. Therefore, the higher molecular weight mitochondrial proteins from sterile plants detected with anti-ORF138 antibodies are indeed dimeric forms of the protein. It also shows that ORF138 is highly prone to oligomerization. It is interesting to note that although the apparent molecular mass of monomeric ORF138 from plant extracts is always higher than the theoretical molecular mass (in this study the apparent molecular mass of

ORF138 from plant cells was around 24 kDa), the monomeric ORF138 produced *in vitro* has a molecular mass much closer to the theoretical estimate (19 kDa).

We investigated the number of monomers that can associate in plant mitochondria. We ran various amounts of mitochondrial proteins extracted from sterile plants on a 5-15% acrylamide gradient gel, without preheating the samples or adding reducing agent, to preserve oligomers. The protein bands were transferred to a membrane, which was probed with antibodies against ORF138. We detected up to six bands (Fig. 1C), suggesting that ORF138 may form oligomers (up to hexamers) in sterile plant mitochondria.

We then investigated whether ORF138 oligomerization was linked to the hydrophobic or hydrophilic moiety of the protein, or correlated with the presence of cysteine residues. We produced truncated proteins lacking the first 43 amino acids or consisting exclusively of the first 57 amino acids of ORF138 (respectively ORFD1-43 and ORFD58-138, see Fig 2 and Materials & Methods) *in vitro* in the same conditions as the whole ORF138 protein. Both truncated proteins dimerized (Fig. 1D). The ratios of dimeric to monomeric forms of the truncated proteins were found to be similar to those for whole ORF138. Thus, the first two cysteines do not seem to be involved in ORF138 dimerization, as ORFD1-43, which lacks these residues, dimerized. Other, unidentified structural features are, therefore, probably involved in ORF138 oligomerization.

### **ORF138 strongly inhibits the growth of *E. coli* cells**

The *orf138* gene was inserted into pET29a(+) (Novagen) for expression in *E. coli* under control of the T7 promoter, following IPTG induction (see Materials & Methods). Truncated forms of the gene, encoding incomplete ORF138 proteins, were also inserted into pET29a(+). Figure 2 indicates the parts of the gene expressed from the resulting plasmids.

Production of ORF138 in bacteria, strongly decreased growth rate in liquid medium (Fig. 3A) and plating efficiency on solid medium (data not shown). In contrast, production of a completely unrelated control protein (pETC) in the same conditions did not affect the growth of *E. coli*.

We investigated which part of the ORF138 protein was responsible for *E. coli* growth inhibition by producing the truncated forms of ORF138 — ORFD1-43 (hydrophilic moiety, lacking the first 43 amino acids) and ORFD58-138 (hydrophobic moiety, containing the first 57 amino acids) — in *E. coli* in parallel with whole ORF138 (Fig. 3B). ORFD1-43 did not

significantly affect *E. coli* growth. ORFD58-138 inhibited bacterial growth, but to a much lesser extent than the whole protein.

To determine whether growth inhibition correlated with protein production, we checked production of ORF138 and its truncated derivative, ORFD1-43, by extraction of total proteins after induction, SDS-PAGE and western-blot analysis with purified anti-ORF138 IgG (see Materials & Methods) (Fig. 4A, lanes 1, 2, 5 and 6). As the anti-ORF138 antibodies obtained were raised against a truncated form of the protein, ORFD1-43, they did not detect the ORFD58-138 protein in *E. coli* extracts. We found that ORFD1-43 production was at least one hundred times more efficient than complete ORF138 production in bacteria: in Fig. 4A, extracts from pETD1-43-bearing strains were diluted 1 : 50 before analysis to make it possible to detect both proteins on the same western blot. ORFD1-43 levels in bacterial extracts were estimated at 600 to 800 pmol of protein per OD unit, using an S-Tag rapid assay kit. This detection system detected neither whole ORF138 nor ORFD58-138 in these conditions (data not shown). The difference in accumulation between ORFD1-43 and the ORF138 and ORFD58-138 proteins was also clear on Coomassie blue- or silver-stained gels, on which ORFD1-43 was readily detected, whereas the other two proteins were never detected (data not shown). These results confirm the large difference in accumulation observed between ORF138 and ORFD1-43 on western blots of bacterial extracts. They also suggest that ORFD58-138, like ORF138, accumulates at very low levels in *E. coli* cells.

Negative controls consisted of total extracts of *E. coli* BL21(DE3)pLysS containing the pETC construct grown in the absence or presence of IPTG; no signal was detected (data not shown).

Fractionation of *E. coli* extracts showed that ORF138 associates with the insoluble fraction (Fig. 4A, lanes 3 and 4). We treated the insoluble fractions with detergent, to solubilize membrane proteins, or urea, to solubilize any inclusion bodies (Fig. 4B). Following detergent treatment, the supernatant contained large amounts of ORF138, although some of the protein remained associated with the pellet. In contrast, very little ORF138 was detected in the supernatant after urea treatment. These results strongly suggest that ORF138 was associated with the membrane fraction of *E. coli* extracts. ORFD1-43 was detected both in the soluble and in the insoluble fractions, despite the fact that it lacked the predicted hydrophobic trans-membrane domain of ORF138 (Fig. 4A, lanes 7 and 8). When we performed detergent and urea treatments on insoluble fractions from *E. coli* cells expressing the ORFD1-43 protein, the truncated protein was solubilized by both treatments, but with different efficiencies. After

detergent treatment, approximately half of the protein was present in the soluble fraction, whereas after urea treatment, almost all of the protein was soluble (data not shown). These results indicate that the partial insolubility of the ORFD1-43 protein was mainly due to inclusion in protein bodies.

To determine more precisely the location of the ORF138 protein in *E. coli*, we performed membrane fractionation by sucrose step gradient centrifugation. Enrichment of the inner membrane and outer membrane fractions was quantified by measuring NADH oxidase activity for the inner membrane (Osborn et al. 1972) and 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) content for the outer membrane (Karkhanis et al. 1978) (Fig. 4C). We found that the fraction with high NADH oxidase activity was substantially enriched in the ORF138 protein, indicating that ORF138 associated with the inner membrane in *E. coli*. We performed alkaline carbonate treatments on the inner membrane enriched fraction of *E. coli* expressing ORF138. Our results indicate that ORF138 is an intrinsic membrane protein in bacteria (Fig. 4D).

ORF138 is present in plant mitochondrial membranes and the inhibition of efficient oxidative phosphorylation has often been suggested as the mechanism underlying cms in plants. Thus, we investigated whether the ORF138-mediated inhibition of *E. coli* growth was associated with an inhibition of respiration. We used an oxygen electrode to measure the oxygen consumption of bacteria that did and did not produce ORF138. Oxygen consumption was measured at induction and two hours later (see Materials & Methods). Oxygen consumption was similar in *E. coli* cells producing ORF138 and controls, suggesting that respiration was not affected by ORF138 in *E. coli* cells (Table 1). We carried out three independent experiments. In one experiment, BL21(DE3)pLys cells (with and without pET29a(+)) were also analyzed and gave similar results to strains producing heterologous proteins (data not shown).

### **Production and mitochondrial targeting of ORF138 modifies mitochondrial morphology**

We used the yeast *S. cerevisiae* as a heterologous eukaryotic model, to investigate whether ORF138 had a general effect on mitochondria. The A+T content of the coding sequence of the *orf138* gene is high (65%) and it carries an internal putative polyadenylation site (AATAAA). To make this gene more like a nuclear gene, we used PCR to synthesize a version of this gene (*orf138n*) that encoded exactly the same peptide, but that had an A+T content of only 50% and no internal polyadenylation signal (Fig. 5A). We constructed a chimeric gene in which the *orf138n* and *gfp* coding sequences were fused. The proteins were targeted to mitochondria by

fusing their coding sequences to the mitochondrial presequence of the *Nicotiana plumbaginifolia* b ATPase gene (*preb*; see Materials & Methods). The encoded presequence consists of the first 59 amino acids of the b-subunit precursor and includes the cleavage site. This sequence has been shown to be sufficient for targeting proteins (in particular GFP) to plant and yeast mitochondria (Chaumont et al. 1995; Logan and Leaver 2000; Duby et al. 2001). We constructed three genes encoding fusion proteins (Fig. 5B). These constructs were designed so that the ORF138, GFP or ORF138-GFP fusion protein would be targeted to mitochondria.

As we did not know whether ORF138 would impair yeast growth, we introduced the *preb-orf138n*, *preb-gfp* and *preb-orf138n-gfp* genes downstream from the *Met25* promoter, which is repressed in the presence of methionine. The plasmids carrying the *preb-gfp*, *preb-orf138n* and *preb-orf138n-gfp* genes were introduced into yeast strain BY384, as was the insert-less vector, pRS426Met. Transformants were selected on glucose-containing selective (synthetic complete, URA minus) medium and replicated on glycerol-containing selective medium. Plating efficiency and colony size were similar in strains transformed with the three constructs and in strains transformed with the insert-less vector. We repeated the experiment, adding 100 mM of methionine to the glucose-containing selective medium. Plates were then replicated in parallel, on glucose- or glycerol-containing selective media, with or without methionine. In these conditions, no significant difference in growth or colony size was detected for any of the constructs (data not shown).

We observed yeast strains producing mitochondrion-targeted GFP and ORF138-GFP fusion proteins by fluorescent microscopy, after growth in galactose synthetic complete (SC) medium without methionine (Fig. 6). Yeast cells producing *preb*-GFP displayed numerous fluorescent organelles, associated in a tubular branched network, as previously described (Westermann and Neupert 2000; Dimmer et al. 2002). In contrast, cells producing *preb*-ORF138-GFP displayed fluorescence concentrated in globular organelles, reminiscent of certain *mdm* mutants (Dimmer et al. 2002). Images obtained by light and fluorescent microscopy were used to count the number of GFP expressing cells. The percentage of GFP-expressing cells exhibiting globular shaped mitochondria was calculated. The number of GFP-expressing cells was counted on six or ten different images for cells expressing *preb*-GFP or *preb*-ORF138-GFP respectively. The cells on each image were counted three times by three different researchers and the results are summarized in table 2. It is interesting to note that the number of cells exhibiting detectable fluorescence was significantly lower for the *preb*-ORF138-GFP expressing cells than for the *preb*-GFP expressing cells (Fig. 6; Table 2).

We checked that proteins were correctly synthesized, by extracting total proteins from several transformants, carrying out SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies against ORF138 and/or GFP. Yeast strains carrying the various constructs were found to produce the fusion proteins correctly (Fig. 7, A & B). The amount of protein detected with both antibodies was lower for the ORF138-GFP fusion protein than for the GFP and ORF138 unfused proteins.

Mitochondria were purified from yeast strains producing either the preb-ORF138 or preb-ORF138-GFP proteins. Analysis after alkaline carbonate treatment followed by centrifugation showed that both proteins are intrinsically associated to mitochondrial membranes (Fig. 7 C).

To localize precisely the fusion proteins in yeast mitochondria, mitochondrial extracts were fractionated into outer membrane and inner membrane enriched fractions. The efficiency of fraction enrichment was checked by immunolocalization of ferrochelatase (an inner membrane protein) or porin (an outer membrane protein). Immunolocalization of ORF138 in fractions from preb-ORF138 producing yeast cells showed that the protein was present in both the outer and inner membranes (Fig.7D). Similar levels of ORF138 were detected in both fractions, strongly suggesting that the protein was associated with both mitochondrial membranes in these cells. Immunolocalization of ORF138 in fractions from preb-ORF138-GFP producing yeast cells showed that the protein was only present in the outer membranes of these cells (Fig.7E). The protein was only barely detectable in whole mitochondrial extracts from these cells as the amount of fusion protein produced (and probably the amount of cells efficiently producing the fusion proteins) was low. The results were confirmed by immunolocalization of the GFP moiety of the fusion protein (Fig. 7E).

### **Production and mitochondrial targeting of ORF138 in plant cells affects mitochondrial morphology**

We checked that our observations were not due to unusual behavior of the ORF138-GFP fusion protein in yeast mitochondria by carrying out expression experiments in plants. First, we performed transient expression experiments. We bombarded onion epidermal cells with particles coated with constructs encoding preb-GFP, preb-ORF138-GFP, or both preb-GFP and preb-ORF138. In plant cells producing preb-GFP, the fluorescence appeared in numerous small foci (Fig. 8 A). In plant cells producing preb-ORF138-GFP, fluorescence appeared in foci of heterogeneous size, with large patches suggestive of an aggregation of

organelles (Fig 8 B) and reminiscent of the mitochondrial morphology observed in some *Arabidopsis* mutants (Logan et al. 2003). In co-bombardment experiments with the two plasmids carrying the *preb-orf138n* and *preb-gfp* genes, the phenotype was intermediate to that observed in the cells transformed with the single plasmids. The organelles in these co-transformants were larger and less numerous than in cells producing only preb-GFP, and these organelles were slightly less heterogeneous in size than in cells producing the ORF138-GFP fusion protein (Fig. 8 C). We consistently found (four independent experiments) that the number of fluorescent cells was significantly lower for the preb-ORF138-GFP transient transformants than for the preb-GFP transient transformants. Similar results were obtained in transient expression experiments involving the particle bombardment of *N. benthamiana* leaves with the same constructs (data not shown).

We produced stable *Arabidopsis* transformants producing the preb-GFP, preb-ORF138-GFP and preb-ORF138 constructs (see Material and Methods). More than 50 independent transformants were obtained for each construct. The number of male sterile plants among these transformants was not significantly higher than that observed in similar experiments performed routinely in the laboratory with other constructs. For each GFP construct, we analyzed several independent transformants by fluorescence microscopy. GFP fluorescence was readily detected in most (more than 80%) of the transgenic plants carrying the preb-GFP construct. Fluorescent organelles were observed in several cell types, including the trichomes (Fig. 8 D & E), epidermal cells and stomatal guard cells. No fluorescent organelles were observed in the tapetal cells of the anther or in the microspores (data not shown). These results show that CaMV 35S promoter activity is low, and possibly non-existent, in these cell types; similar observations were made previously by (Medberry et al. 1992). In contrast, GFP fluorescence was observed in less than 10% of the transgenic plants carrying the preb-ORF138-GFP construct. Fluorescent organelles were visible only in the trichomes of plants producing preb-ORF138-GFP. This fluorescence was clearly visible through the microscope, but the contrast was digitally enhanced to obtain clear images (Fig. 8 F & G).

## **DISCUSSION**

The physiological mechanism of cytoplasmic male sterility in plants is difficult to study due to the pollen-specific phenotype, although it is known to be controlled by mitochondrial genes that are constitutively expressed in most cases (Hanson and Bentolila 2004). Recent reports

have provided insight into mitochondrial interference in pollen development (Kitashiba et al. 1999; Linke et al. 2003; Sabar et al. 2003; Yui et al. 2003) but in most cases, the link with the cms gene product is neither established, nor direct. Studies of the structural and functional features of the cms gene product are a starting point for the elucidation of the physiological mechanism underlying this phenomenon. The only system investigated in this way to date is the Texas cms system in maize. However, this system may be unique among cms systems as it is associated with fungal toxin susceptibility, and it is unclear whether this cytoplasm is maintained in natural (wild) populations (Wise et al. 1999).

The Ogura cms system is not known to be associated with any phenotype other than male sterility. It seems to have been maintained in natural populations of wild radish (*R. raphanistrum*) (Yamagishi and Terachi 1997) before its transfer into cultivated radish (Ogura 1968) and cultivated brassicas (Bannerot et al. 1974; Pelletier et al. 1983). Thus, biochemical and physiological studies of this cms system may help to elucidate the role of mitochondria in the male gametogenesis developmental program. However, the poor accessibility of the target tissue (the tapetum of anthers) makes the task difficult. Experiments *in vitro* and in heterologous systems, such as *E. coli* and *S. cerevisiae*, may facilitate the characterization of ORF138 in terms of structure and function, as has been done for T-URF13 (Levings and Siedow 1992; Wise et al. 1999) and mitochondrial carriers (Haferkamp et al. 2002). Determination of the structure of ORF138 in such systems should provide useful information for the design of experiments investigating the physiology of cms.

We show here that ORF138, like maize T-URF13, is associated with the inner mitochondrial membrane of sterile plants (Rhoads et al. 1995). Previous studies showed that cms-associated proteins are associated with the mitochondrial membrane fraction in *Petunia* (Nivison and Hanson 1989) and sunflower (Horn et al. 1996), but did not report whether the proteins were located in the inner membrane. Precise localization of the cms protein is required before we can speculate on the possible mechanism of cms. We could then look for possible associations between ORF138 oligomers and the inner membrane protein complexes of sterile plants. For example, an inner membrane location is consistent with mechanisms involving inhibitory interaction with respiratory complexes, as was recently suggested for PET1 cms in sunflower (Sabar et al. 2003). We also provide strong evidence for oligomerization of the ORF138 polypeptide. We found that the ORF138 polypeptide required no mitochondrial cofactor (such as chaperones) or association with membranes to undergo dimerization. Higher molecular mass signals were also observed for the radish ORF125 kosena cms-associated



protein, although the nature of these signals was not investigated (Iwabuchi et al. 1999). As ORF125 is almost identical to ORF138, except that it lacks one of the 13aa repeats, we suggest that the higher molecular mass signals detected by (Iwabuchi et al. 1999) are oligomeric forms of ORF125. This self-association of ORF138 (and probably ORF125) is similar to that for T-URF13, which forms oligomers in the membranes of mitochondria from sterile plants and of *E. coli* (Korth et al. 1991). It is not yet possible to compare the structures of ORF138 and T-URF13 in mitochondrial membranes, but both systems display oligomerization and inner membrane localization. This may provide an indication of the structural prerequisites for a chimeric mitochondrial protein interfering with male gametogenesis. We now need to investigate whether ORF138 associates with other mitochondrial proteins in sterile plants.

The phenotype induced by the production in *E. coli* cells of the T-cytoplasm-specific male sterility protein T-URF13 was conditioned by adding fungal toxins or methomyl (Dewey et al. 1988). However, another cms-associated protein, ORF522 from sunflower, has been reported to affect *E. coli* growth (Nakai et al. 1995). The Ogura cms-specific protein, ORF138, also had a toxic effect in *E. coli*, similar to that reported for sunflower ORF522. The toxic effects of ORF138 and ORF522 in *E. coli* cells may result from overloading of the protein synthesis machinery. However, this is very unlikely for ORF138: although ORF138 synthesis is readily detected by immunoblotting, the amount of protein produced is insufficient for direct silver staining of gels loaded with either total or fractionated extracts, or detection with the S-Tag rapid assay kit. In contrast, the accumulation of large amounts of control proteins had no effect on *E. coli* growth. Therefore, ORF138 is toxic at low concentrations in *E. coli* cells.

We have shown that ORF138 is an intrinsic protein of the inner membrane in *E. coli*. Thus, the subcellular localization of this protein in bacteria is analogous to its submitochondrial location in plants. We can now investigate the membrane topology of the protein using the *E. coli* system. These studies should provide clues as to the function of ORF138.

The mechanism of cytoplasmic male sterility in plants may involve an inability to reach a threshold of energy supply during male gametogenesis (Levings 1993; Balk and Leaver 2001; Sabar et al. 2003). In this case, the toxic effect of ORF138 protein in *E. coli* may result from the inhibition of respiration. We tested this hypothesis by measuring oxygen consumption in *E. coli* cells producing ORF138. Although ORF138 abolished growth, it had no effect on respiration. These results, taken together with those obtained by Farineau et al (Farineau et al.

1990) showing that respiration rates are unmodified in sterile plants, demonstrate that alternative hypotheses are needed to explain the strong inhibitory effect of ORF138 on *E. coli* growth, and the sterility phenotype.

The properties of the truncated forms of ORF138 produced in *E. coli* provide further insight into the features determining the structural and functional characteristics of the protein. The truncated proteins (ORFD1-43 and ORFD58-138) dimerized as efficiently as the whole protein *in vitro*. As two of the three cysteine residues of ORF138 are not present in ORFD1-43, these residues — cysteine residues 12 and 20 — cannot be essential for oligomerization. In contrast, none of the truncated proteins inhibited *E. coli* growth as strongly as the whole protein. ORFD1-43 was clearly not toxic to *E. coli*, whereas ORFD58-138 inhibited the growth of *E. coli* significantly less strongly than did the whole protein. As we were unable to quantify the amount ORFD58-138 produced, we were unable to compare its toxic effects directly with those of the complete ORF138. However, our results suggest that maximal toxicity in *E. coli* involves both the hydrophilic and hydrophobic domains. Thus, some feature of the complete protein (absent from both truncated forms) may be important for toxicity in bacteria. Furthermore, the accumulation of small amounts of ORFD58-138 and the weak effect of this protein on *E. coli* growth suggest that the small amount of ORF138 accumulating in bacteria is not directly related to toxicity. Our results suggest that certain structural features of the ORF138 protein, which are absent from truncated forms, make this protein toxic to *E. coli*. Mutational analysis of the ORF138 protein should now be carried out to identify the residues, domains or features involved in toxicity in *E. coli*, and possibly in determining structural properties.

Although bacterial cells are very useful for investigating the structure of ORF138, the large differences between bacteria and plant mitochondria prevent this system from being useful for providing a thorough understanding of the physiological effects of the cms-inducing protein. We therefore produced ORF138, fused to a mitochondrial presequence, in yeast, which has proven to be a powerful tool for studies of mitochondrial function and biogenesis. In contrast to what was observed in bacteria, the production of preb-ORF138 in yeast cells had no obvious effect on their growth or plating efficiency, on fermentable or nonfermentable carbon sources, in the conditions tested.

GFP fusion proteins made it possible to study mitochondria in yeast by fluorescence microscopy. GFP has proved to be a powerful tool for monitoring mitochondrial shape *in vivo*

and changes in mitochondria morphology in various conditions (Logan and Leaver 2000; Westermann and Neupert 2000; Dimmer et al. 2002; Logan et al. 2003; Gorsich and Shaw 2004). Cells producing preb-ORF138-GFP had mitochondria that seemed to be fused together to give a globular structure rather than multiple tiny mitochondria often associated in a tubular network, as observed in cells producing preb-GFP. The shape of yeast mitochondria changes rapidly during cell growth and can be modified by mutations affecting the division or fusion of mitochondria (Sesaki and Jensen 1999) and by mutations affecting other mitochondrial functions, including respiration (Dimmer et al. 2002). However, strains producing preb-ORF138 (or preb-ORF138-GFP) showed no inhibition of respiration, at least in the conditions tested in this study. The morphological phenotype observed when ORF138 was targeted to yeast mitochondria was similar to that of the yeast mutants *mdm32* and *mdm34* (Dimmer et al. 2002). Elucidation of the function of the corresponding genes in yeast will make it possible to understand how ORF138 modifies mitochondrial morphology.

We verified that the fusion proteins were produced and targeted to mitochondria. Our finding that the number of fluorescent cells was lower for the preb-ORF138-GFP producing cells than for the preb-GFP producing cells may be explained by a combination of two factors. Firstly, the amount of protein produced was lower for the preb-ORF138-GFP transformants than for the preb-GFP transformants. Secondly, the ORF138-GFP fusion protein may have been less efficiently folded into the fluorescent configuration than the preb-GFP protein. Indeed, we found that the level of the ORF138-GFP fusion protein was reproducibly lower than that of the ORF138 or GFP proteins in yeast cell extracts. The detection of preb-ORF138 and preb-ORF138-GFP in the mitochondria of cells transformed with these constructs confirmed the mitochondrial localization of the proteins. We then performed fractionation experiments on mitochondrial extracts and found that the preb-ORF138 protein was present in both mitochondrial membranes whereas, the preb-ORF138-GFP fusion protein was only present in the outer membrane fraction. This latter result was confirmed by immunodetection of the GFP moiety of the fusion protein. It is interesting to note that we detected a significant portion of the mature protein lacking the targeting sequence (see Fig. 7B, 7D), suggesting that at least some of the protein reached the matrix (Gakh et al. 2002). These results indicate that the proteins produced are efficiently targeted to mitochondria and that a significant proportion remains in the outer mitochondrial membrane. The association of ORF138 with yeast mitochondrial membranes was resistant to alkaline carbonate treatment, strongly suggesting

that ORF138 is an intrinsic membrane protein. Thus, the modification of mitochondrial morphology in yeast cells expressing ORF138 may be linked to a combination of factors, including the structural properties of the protein and its submitochondrial location. Two principle studies can now be undertaken. Firstly, we will investigate the structural features of the ORF138 protein leading to the modification of mitochondrial morphology by using mutated and/or truncated forms of the protein and by looking for association with other mitochondrial proteins. Secondly, we will generate transgenic yeast cells in which the *orf138* gene has been inserted into the mitochondrial genome. As the genetic code used by yeast mitochondria is different from the genetic code used for nuclear genes and for plant mitochondrial genes, this experiment will require recoding of the *orf138* gene.

In all the cell types studied, we found that the ORF138 protein was able to self-associate and integrate into membranes, and that this localization was not altered by treatment with alkaline carbonate. This behavior appears to constitute a major property of the protein and may be important for ORF138 function. This finding provides a good starting point for further investigations.

We checked that our observations of the ORF138-GFP fusion protein in yeast were reproducible in plant cells using transient expression experiments. We observed changes in plant mitochondria morphology in cells producing the ORF138-GFP protein. Co-transformants producing preb-ORF138 and preb-GFP proteins also displayed clear changes mitochondrial morphology. However, results obtained using this transient expression system should be interpreted with caution as in these experiments the ORF138 protein was targeted to the mitochondria from the cytosol, whereas in male sterile plants *orf138* is a mitochondrial gene. Furthermore, our analysis of mitochondrial fractions from yeast cells producing the preb-ORF138 and preb-ORF138-GFP proteins suggests that a large proportion of the ORF138 protein might not reach the inner mitochondrial membrane and/or might not be folded correctly. This may explain, at least in part, our inability to produce male sterile plants by nuclear transformation. Similar problems have been encountered in other CMS systems (Chaumont et al. 1995; Hanson and Bentolila 2004). Our observations highlight the need for a thorough study of the structural and functional properties of ORF138 in heterologous systems. Results obtained from these studies will allow hypotheses to be generated that could be tested in sterile plants. Furthermore, the structure and physiology of mitochondria in tapetal cells, which seem to be the target of the cms mechanism, need to be investigated. However, these mitochondria are difficult to access and studies of this type remain technically

challenging. The more we learn about the structure and effect of cms-associated proteins in heterologous, easy-to-handle systems, the easier it will be to address precise questions in plants. These systems may also be useful for developing the necessary tools that will allow the mechanisms underlying this plant-specific and evolutionary important phenomenon (Werren and Beukeboom 1998; Frank 2000; Budar et al. 2003) to be elucidated.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Preparation of plant mitochondrial extracts and fractionation**

Mitochondria from etiolated seedlings of male sterile *Brassica napus* were isolated by differential centrifugation, as described by Millar et al. (Millar et al. 2001). We harvested 50 to 100 g of etiolated seedlings and immediately cooled this tissue on ice. Etiolated seedlings were ground in a Waring blender with at least 2 mL of homogenization buffer (300 mM sucrose, 25 mM tetrasodiumpyrophosphate, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM EDTA, 1% (w/v) PVP-40, 1% (w/v) BSA, 20 mM ascorbate, pH 7.5) per gram of tissue. The homogenate was then filtered through four layers of Miracloth and subjected to differential centrifugation. The organelle enriched pellet was loaded on a Percoll step gradient (4 mL 50% / 5 mL 20% / 2.5mL 14% (w/v) of Percoll in washing buffer: 300 mM sucrose, 10 mM HEPES, 0.2% BSA, pH 7.5) and centrifuged for one hour at 9,800 g at 4°C. Mitochondria were collected from the 50/20 interface, diluted four times with washing buffer and centrifuged at 15,000 g for 20 minutes at 4°C. After a second washing step, the pellet was suspended in a minimal volume of washing buffer.

We used a combination of osmotic shock and sucrose step gradients to separate the inner and outer membranes. Mitochondria were diluted in low osmotic strength buffer (10mM HEPES, pH 7.2) until the sucrose concentration reached 10mM. The mitochondria were then gently agitated for 20 minutes at 4°C, after which the sucrose concentration was increased to 300mM by adding a high osmotic strength buffer (2M sucrose, 10mM HEPES, pH7.2). Mitochondria were again subjected to gentle agitation for 20 minutes at 4°C. The sample was then loaded onto a sucrose step gradient (3mL 45%, 7 mL 32%, 4 mL 15% sucrose in 10 mM HEPES pH 7.2) and centrifuged at 150,000 g for one hour at 4°C in a swinging rotor. Outer membrane enriched vesicles were collected from the 15/32 interface; the mitoplast enriched fraction was

collected at the 32/45 interface. Both fractions were diluted with low osmotic strength buffer and membranes were concentrated by centrifugation at 100,000 *g* for one hour at 4°C.

NADH cytochrome c oxidoreductase activities were measured according to (Douce et al. 1972).

### **SDS-PAGE of plant mitochondrial extracts and immunodetection of ORF138**

Extracts from fractionation experiments were analyzed by SDS-PAGE after adding Laemmli buffer (Laemmli 1970) supplemented with 2.5 % β-mercaptoethanol. The concentration of acrylamide used for PAGE is given in the legend to each figure.

We estimated the number of associated ORF138 monomers *in vivo* as follows. Mitochondria (1 mg of protein) were prepared as described above and sedimented by centrifugation at 15,000 *g* for 15 minutes in a benchtop centrifuge. The pellets were resuspended in 75 mL of ACA buffer (500 mM EDTA, 750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, pH 7.0). Membrane proteins were solubilized by adding 15 mL of 10% (w/v) n-dodecyl β-D-maltoside. The samples were incubated on ice for 30 minutes, Laemmli buffer was added and the sample was immediately run on a 5 - 15 % acrylamide SDS gradient gel, without heating or adding reducing agent.

After electrophoresis, proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (HybondC, Amersham) and ORF138 was detected as previously described (Grelon et al. 1994).

### **Strains and plasmids**

Bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium, supplemented with chloramphenicol (34 mg.mL<sup>-1</sup>) and kanamycin (50 mg.mL<sup>-1</sup>), or carbenicillin (100 mg.mL<sup>-1</sup>) when appropriate. We obtained pET-29a(+) and the *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS from Novagen. We used standard techniques to manipulate plasmid DNA isolated from XL1-Blue (Stratagene). Plasmid DNA was prepared with Qiagen-tip20 columns (Qiagen) according to the manufacturer's protocols.

*S. cerevisiae* strain BY384 (*Matα; his3D25; leu2D1; lys2D2102; trp1D63; ura3-52*), provided by J. Boeke, was used. It was grown in synthetic complete (SC) medium without uracil and methionine. We added 100 mM of methionine to repress expression of the genes cloned downstream from the Met25 promoter. The carbon source in the medium was 2% glucose, 2% galactose, or 3% glycerol. Yeast cells were incubated at 30°C for 1 to 3 days.

### **Cloning of *orf138* into an *E. coli* expression vector**

The DNA fragment encoding mitochondrial ORF138 was inserted into pBluescript (Stratagene) and the resulting plasmid (pSK138) sequenced (Bonhomme et al. 1992). The following primers, containing a *Bam*HI restriction site, were used for PCR, to amplify the complete DNA fragment corresponding to the whole *orf138* coding region, using pSK138 as a template:

5'-CGGGATCCACTAGTATGATTACCTTTTTTCGAA-3'

5'-CGGGATCCAAGCTTATTTTTCTCGGTCCATT-3'

The amplified fragment was inserted into the *Bam*HI site of pBluescript and used to transform the XL1-Blue strain of *E. coli*. The *Bam*HI restriction fragment was checked by sequencing, purified from an agarose gel after electrophoresis, and inserted into the *Bam*HI site of pET-29a(+) (Novagen). Mini-preparations were used to isolate the recombinant plasmid and the correct orientation of the insert was checked by restriction analysis. The resulting plasmid was designated pET138 (Fig. 2B) and contains 440 base pairs including *orf138*. The protein encoded by pET138 plasmid is a fusion of ORF138 with the pET29-encoded S-Tag.

A *Bam*HI-*Xba*I fragment from pET138 corresponding to the 57 first amino acids of the protein was inserted into pBluescript. A *Bam*HI-*Not*I fragment was then purified from this plasmid and subcloned into pET29a(+), giving the pET(D58-138) plasmid encoding the hydrophobic N-terminal portion of ORF138 (Fig. 2B).

The 3' end of *orf138*, encompassing codons 43 to 138, corresponds to an *Xba*I-*Eco*RI restriction fragment from a previously described plasmid (Grelon et al. 1994). The 310 base pair *Bam*HI-*Eco*RI fragment from this plasmid was purified and inserted into pET29a(+). The resulting plasmid was designated pET(D1-43) (Fig2B). The various constructs were used to transform competent cells of *E. coli* strain BL21(*DE3*)pLysS from Stratagen.

As a control in some experiments, we used a plasmid, pETC, which encoded a hydrophilic peptide that was produced in large amounts but did not affect *E. coli* growth. This plasmid was kindly provided by F. Feuerbach and contains part of the orf of Tnt1 from *Nicotiana tabacum* (nucleotides 681 to 2758, accession number X13777, GenBank, EMBL), inserted between the *Nde*I and *Bam*HI sites of pET29a(+).

### ***In vitro* transcription and translation of the ORF138 protein**

Circular pET138, pET(D58-138) and pET(D1-43) (containing the *orf138* gene or different parts of it, cloned downstream from the T7 RNA polymerase promoter) DNA was used to direct protein synthesis in a rabbit reticulocyte lysate system (TnT Coupled Reticulocyte Lysate System kit, Promega) according to the manufacturer's protocols. The 50 mL reaction mixture contained 1 mg DNA and 40 mCi of <sup>35</sup>S-methionine and was incubated at 30°C for 60 min. A negative control without DNA and a positive control, using 1 mg of the control DNA provided in the kit (luciferase gene cloned downstream from the T7 RNA polymerase promoter) were included in each experiment.

### **Monitoring of *E. coli* growth rate and determination of plating efficiency**

Overnight cultures of BL21(*DE3*)pLysS harboring pET138, pET(D1-43), pET(D58-138) or pETC were obtained by using a single colony to inoculate 1.5 ml of LB media supplemented

with chloramphenicol and kanamycin and incubated overnight at 37°C. A flask containing 200 mL of LB medium supplemented with the same antibiotics was inoculated with 200 mL of the preculture and incubated at 37°C, with shaking. At an OD<sub>600</sub> of 0.3, the culture was separated into two subcultures and IPTG was added to one of the 100 mL cultures at a final concentration of 0.5 mM. The growth of the cultures was monitored by withdrawing aliquots at various times and measuring the OD at 600 nm.

### **Respiration measurements**

We determined oxygen consumption in *E. coli* cells polarographically, using a Clark type oxygen electrode fitted to a 2 mL water-jacketed closed chamber (Packer et al. 1966). BL21(DE3)pLysS cells containing pET138 and pETC were cultured in 3 mL of LB medium containing antibiotics at 37°C. Each preculture was diluted 1 in 1000 in fresh LB medium containing antibiotics. The resulting culture was incubated at 37°C until the cells reached early exponential growth phase. Each culture was then divided in two. One half of the culture was subjected to induction with 0.5 mM IPTG whereas the other was used as a control. Both were incubated at 37°C, with shaking, for an additional 2 h. Cellular respiration was measured at 37°C in HEPES-KRP buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM D-glucose and 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Respiration was measured in 1x10<sup>8</sup> cells.mL<sup>-1</sup> and 2x10<sup>8</sup> cells.mL<sup>-1</sup> for each culture. The results are expressed as a mean of the two measurements.

### **Affinity purification of antibodies**

Mitochondria were prepared from *Brassica napus* male-sterile plants using a previously described procedure (Bellaoui et al. 1997). Purified mitochondria obtained from 10 grams of flower buds from greenhouse-grown plants were lysed in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) supplemented with 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) b-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol. Proteins were precipitated in acetone, collected by centrifugation and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH7.5).

Rabbit anti-ORF138 IgG was affinity-purified using a modified version of the procedure described by (Lin et al. 1989). Total mitochondrial protein extracts from *B. napus* sterile plants were spotted onto a nitrocellulose membrane (HybondC, Amersham). The membrane was incubated for 1 h at 37°C with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) supplemented with 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20 and 3% (w/v) nonfat milk powder (buffer A). The membrane was then incubated with crude rabbit anti-ORF138 immune serum (Grelon et al. 1994) (1 ml/cycle) for 1 h at 37°C. The membrane was washed four times at 37°C for 1 min each with buffer B (bufferB = buffer A minus milk powder). The bound antibodies were eluted with three washes (1 min) in



0.5 mL 5 mM glycine-HCl (pH 3) containing 500 mM NaCl, 0.25% (v/v) Tween 20 and 1% (w/v) BSA. Eluates were pooled and neutralized with solid Tris. The membrane was washed three times, in 3 ml of buffer B. We then carried out six further cycles of incubation with the ORF138 antiserum, followed by washing and elution. Affinity-purified IgG was divided into 0.25 mL aliquots, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

For use with bacterial extracts, antibodies were in some cases further purified as follows. We ran several mg of BL21(DE3)pLysS total proteins on an 8 % polyacrylamide gel and transferred them onto nitrocellulose (Hybond-C, Amersham). The membrane was then cut into pieces (approximately 2 x 2mm) and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in PBS-T (8.7 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 1.44g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4, 0.05% (v/v) Tween 20) with 5% (w/v) nonfat milk powder. The pieces of membrane were rinsed in PBS-T, and incubated in 1 mL of serum for 24 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ . The serum was recovered by centrifugation and incubation with new nitrocellulose pieces onto which bacterial proteins had been blotted. This step was repeated at least four times. The purified serum was supplemented with 3% (w/v) BSA and 50% (v/v) glycerol (final concentrations) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **Extraction and fractionation of bacterial proteins**

Bacteria carrying pET138, pET(D1-43), pET(D58-138) or pETC were cultured as described above for the monitoring of *E. coli* growth rate. After one hour of induction, bacteria from the uninduced control and each induced culture were boiled in Laemmli loading buffer (Laemmli 1970) to yield total extract. The other induced samples were used for the separation of soluble and insoluble protein fractions by resuspending cells in lysis buffer (lysozyme 1 mg.mL<sup>-1</sup>, 30 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, pH8) and incubating on ice for 10 mn. Cells were lysed by repeated freezing ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) and thawing ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Cell debris and insoluble proteins were recovered by centrifugation for 10 mn at 6,000g and the supernatant was taken as the soluble protein fraction.

The S-Tag rapid assay kit (Novagen) was used to quantify tagged protein according to the manufacturer's protocol. 0.5 OD<sub>600</sub> units of control and induced cultures were harvested, resuspended in 500 mL of 1% (w/v) SDS and serial dilutions were processed.

We localized ORF138 in *E. coli* cells as follows. Cultures (100 mL) were harvested by centrifugation at 3,000 g for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  after 3 hours of induction. The pellet was frozen in liquid nitrogen and immediately thawed at room temperature. The lysate was then mixed with 7 mL of a dilution buffer (100 mM Tris HCl , pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg.mL<sup>-1</sup> DNase I) per gram of initial pellet. The lysate was then

separated into two tubes and gently stirred at 4°C for one hour. Centrifugation at 50,000 g for 30 minutes at 4°C separated soluble and insoluble fractions. The supernatant (soluble fraction) was kept for further analysis and the pellet (insoluble fraction) was resuspended in 1 mL of dilution buffer supplemented with urea (final concentration of 8 M) or n-dodecyl b-D-maltoside (final concentration of 0.5%). Each tube was gently stirred at 4°C for 30 minutes and centrifuged at 50,000 g for 30 minutes at 4°C to separate the soluble and insoluble fractions. The supernatants were kept for further analysis and the pellets were resuspended in 1 mL of dilution buffer. Each pellet sample was then treated for SDS-PAGE.

The fractionation of *E. coli* membranes was performed as follows. After induction, bacteria were harvested by centrifugation at 4°C for 15 minutes at 5,000 g. Cells were concentrated 100-fold by resuspending the pellets in 25 mM sodium phosphate pH 7.0 and were ruptured by a single pass through a French pressure cell (SLM Aminco) at 16,000 psi. Cell debris and unbroken cells were removed by centrifugation at 4°C for 4 minutes at 12,000 g. A 3 mL volume of lysate was layered onto a 9 mL sucrose step gradient (2mL 68% sucrose / 7 mL 45 % sucrose) and centrifuged in a swinging rotor at 4°C for 20 hours at 250,000 g. The pale brown band at the 68/45 interface and the dark brown band at the top of the gradient were collected and diluted 5-fold with 100 mM Tris-HCl pH 7.5. Membrane vesicles from these two fractions were centrifuged at 4°C for 30 minutes at 250,000 g. Membranes were carefully washed with 100 mM Tris-HCl pH 7.5 and collected by centrifuging at 4°C for 30 minutes at 250,000 g. Finally, membrane vesicles were resuspended in a minimal volume of 100 mM Tris-HCl pH 7.5.

Enrichment of the outer and inner membranes in the fractions was monitored by enzymatic assays. The amount of 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO), a marker of the outer membrane, was determined by using the thiobarbituric acid method (Karkhanis et al. 1978). NADH oxidase activity, a marker of the inner membrane, was determined at 37°C as described by Osborn et al. (Osborn et al. 1972) using a Jasco V-530 spectrophotometer. All assays were carried out in duplicate.

The inner membrane fraction was treated with carbonate to assess the strength of the membrane-ORF138 protein association (Fujiki et al. 1982). Samples were incubated for 30 minutes on ice in 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5 and centrifuged at 4°C for 30 minutes at 100,000 g. The supernatant (soluble fraction) was collected and the pellet (membrane fraction) was resuspended in 100 mM Tris HCl pH 7.5.

### **Synthesis of a nuclear-like form of the *orf138* gene and cloning in the *S. cerevisiae* expression vector**

The *orf138n* coding sequence was fused to the mitochondrial targeting sequence of the b-subunit of the ATP synthase of *Nicotiana plumbaginifolia* (*preb*), kindly provided by Marc Boutry (Boutry and Chua 1985).

A chimeric gene consisting of the *preb* and *orf138n* coding sequences followed by the S65T mutated *gfp* (Haseloff and Amos 1995; Heim and Tsein 1996) coding sequence was also constructed. A control fusion was also constructed from the *preb* targeting sequence and GFP(S65T). Schematic representations of the fusion proteins are shown in Fig 5B. The *preb-gfp* and *preb-orf138n-gfp* genes were inserted between the *EcoRI* and *EcoRV* sites and the *preb-orf138n* gene was inserted between the *HindIII* and *SalI* sites of pRS426Met. The resulting plasmids were named Met-*preb-gfp*, Met-*preb-orf138n-gfp* and Met-*preb-orf138n*, respectively. The pRS426Met vector (Freire et al. 2000) is essentially pRS426 (Christianson et al. 1992) carrying an expression cassette with the Met25 promoter and the PGK terminator.

### **Yeast transformation and determination of plating efficiency**

We used 1.5 mg of DNA corresponding to plasmids Met-*pre-bgfp*, Met-*preb-orf138n*, Met-*preb-orf138n-gfp* and pRS426 to transform strain BY384 as previously described (Gietz et al. 1995). For each transformation, we plated 250 mL of the mixture on SC (-URA) (2 % (w/v) glucose) medium supplemented with methionine. After 2 days of incubation at 30°C, the plates were replicated on SC (-URA) medium containing 3 % (v/v) glycerol or 2 % (w/v) glucose, with or without methionine.

### **Extraction of total yeast proteins**

Yeast cells carrying Met-*preb-gfp*, Met-*preb-orf138n* and Met-*preb-orf138n-gfp* were cultured at 30°C in 25 mL of SC medium (2 % (w/v) glucose) with or without 100 µM of methionine until an OD<sub>600</sub> of about 1.5 was reached. To ensure that equivalent numbers of cells were used, we used a volume corresponding to an OD<sub>600</sub> of 15 (about 10 mL of culture), which was centrifuged for 5 minutes at 3,000 g and the pellet resuspended in 200 mL of Laemmli loading buffer. The cells were vortexed for 5 minutes in the presence of 0.45 mm glass beads and boiled for 5 minutes. The mixture was centrifuged for 5 mn at 10,000g, and an aliquot of the supernatant was used for western-blot analysis.

### **Yeast mitochondria isolation and fractionation**

Yeast mitochondria were isolated from 4 liters of yeast culture in SC medium using the enzymatic method described by Guerin et al (Guerin et al. 1979).

Mitochondrial membranes were fractionated as follows. Mitochondria were resuspended in a solution consisting of 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 7.2. Low osmotic strength buffer (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.2) was added until a sucrose concentration of 10 mM was obtained. The mitochondria were then shaken gently for 20 minutes at 4 °C, after which the concentration of sucrose was adjusted to 250 mM by adding high strength osmotic buffer (2 M sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.2). Mitochondria were then shaken gently for a further 20 minutes at 4°C. The sample was loaded onto a stepped sucrose gradient (3mL 60 %, 7 mL 35 %, 4 mL 25 % sucrose in 10 mM HEPES 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.2) and centrifuged at 150,000 g for one hour at 4°C in a swinging rotor. Outer membrane enriched vesicles were collected from the 25/35 interface; the mitoplast enriched fraction was collected from the 35/60 interface. The two fractions were diluted in low osmotic strength buffer and the membranes are concentrated by centrifugation at 100,000 g for one hour at 4°C. The strength of the association between the proteins and the membranes was assessed by treating the isolated mitochondria with alkaline carbonate as described above for *E. coli*.

### **SDS-PAGE and immunoblot analysis of bacterial and yeast protein extracts**

An aliquot of each culture or fraction was processed by SDS-PAGE. The concentration of acrylamide used for PAGE is given in the legend to each figure. The proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (HybondC, Amersham). Immunoblot experiments were carried out using the following antibodies: purified rabbit ORF138 antisera (diluted 1:200), a mixture of two monoclonal antibodies against GFP (Boehringer; diluted 1:1000), polyclonal rabbit antiserum against ferrochelatase (Hem15; diluted 1:1000), or a monoclonal mouse antibody against porin (Molecular Probes; diluted 1:500). The ORF138 and ferrochelatase antibodies were then detected with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma) and the GFP and porin antibodies, were then detected with peroxidase-conjugated secondary anti-mouse IgG (Caltag). Secondary antibodies were detected with the ECL kit (Amersham). The apparent molecular weights of the proteins were estimated with prestained low- or broad-range molecular weight markers (Biorad) or the prestained MW marker (Fermentas).

### **Introduction of the *orf138n* constructs into plant expression vectors**

The *preb-orf138n*, *preb-gfp*, and *preb-orf138n-gfp* genes were inserted into the single *HindIII* site of an expression cassette containing the CaMV 35S promoter (with a duplicated enhancer sequence) and terminator (T. Michael, unpublished personal communication) in a

derivative of pBluescript (Stratagene). We checked that the orientation of the inserts was correct by restriction analysis. We used these plasmids for transient expression in onion and *N. benthamiana* cells.

For the stable transformation of *Arabidopsis*, *NotI* restriction fragments containing the genes of interest were cloned into the unique *NotI* site of the pEC2 binary vector (Cartea et al. 1998). The resulting plasmid was verified and used to transform an *Agrobacterium* strain (C58C1) carrying the pMP90 helper plasmid.

### **Transient and stable transformation of plant cells**

Tungsten particles (diameter 0.5mM) were sterilized by incubation in 70% ethanol for 10 minutes and rinsed with 1.5 mL sterile water and kept on ice in 50% glycerol until use. These particles 100 mL (15-20 mg) were then mixed with 5 to 10 mg of plasmid DNA (for 3 to 6 shots). Spermidine (40 mL of 0.1 M solution) and 100 mL of 2.5 M CaCl<sub>2</sub> were then added and the mixture kept on ice for 10 minutes, with vortexing every three minutes. The particles were centrifuged for 30 s in a benchtop centrifuge. The supernatant was discarded and the particles were rinsed twice in cold ethanol and finally resuspended in 60 mL of 100% ethanol. The DNA-coated particles were then transferred to macrocarrier disks.

Onion slices or *N. benthamiana* leaves were placed on solid medium (Murashige and Skoog 1962) in Petri dishes and bombarded with the DNA-coated particles using a Biorad PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery system (900 psi rupture disks) according to the manufacturer's instructions.

Explants were then incubated for 48 to 72 hours in a culture chamber before being analyzed by confocal microscopy.

Stable *Arabidopsis* transformants (ecotype WS) carrying the verified constructs were generated using *Agrobacterium* strain C58C1 (pMP90) as described previously (Bechtold et al. 1993).

### **Cytological observations**

Yeasts carrying *Met-preb-gfp*, and *Met-preb-orf138n-gfp* were cultured for two days at 30°C in 2 ml of SC medium (containing 2 % galactose) with or without 100 mM of methionine. Cells were centrifuged for 5 minutes at 4000g, resuspended in 20 ml of culture medium. An aliquot (3 ml) of this cell suspension was then immobilized on glass slides by mixing with 3 ml of 0.8 % low-melting point agarose at 36°C.

Onion slices were peeled and epiderm fragments mounted on microscope slides. *N. benthamiana* leaf fragments were mounted directly on microscope slides.

Cells producing GFP were observed under a Leica TCS-NT confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) with an argon/krypton laser (Omnichrome, Chino, CA). GFP fluorescence was observed using an FITC filter set (BP530/30) with an Argon (488nm) laser beam. Medium-scan (450 lines per second) images (1024 x 1024 pixels) were taken using a 63 x 1.32 NA PL APO objective for yeasts, or a 40 x 0.8 w HCX APO L objective for plant cells.

In some experiments, a sequential filter set with a second photomultiplier was used to collect the transmitted light. In these cases, the light emitted by GFP was collected using the configuration described above.

Transgenic *Arabidopsis* plants were analyzed using a Leica DMRXA2 microscope coupled to a monochromic digital camera (coolsnap HQ). The filter set used for GFP had an excitation band pass of 450-490 nm and an emission band pass of 500-550 nm. Single images were analyzed using the openlab software. The automatic contrast function of AdobePhotoshop was applied to images when required. Both the unmodified and contrast-enhanced images are shown.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank F. Feuerbach, and E. Lesuisse for sharing plasmid constructs and antibodies, respectively. We thank M. Boutry for providing the preb targeting signal-carrying plasmid. We would also like to thank O. Grandjean for help with confocal microscopy and I. Small, M. Grelon, S. Bonhomme, C. Mézard and H. Mireau for critical reading of the manuscript. We are very grateful to D. Day and M. Neuburger for their advice concerning the mitochondrial fractionation experiments and to the reviewers of this manuscript for their constructive comments.

## REFERENCES

- Balk, J. and C. J. Leaver (2001). "The PET1-CMS Mitochondrial Mutation in Sunflower Is Associated with Premature Programmed Cell Death and Cytochrome c Release." *Plant Cell* 13(8): 1803-18.
- Bannerot, H., L. Boulidard, Y. Cauderon and J. Tempé (1974). "Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*." *Proc EUCARPIA Crop Sect, Cruciferae* 25: 52-54.
- Bechtold, N., J. Ellis and G. Pelletier (1993). "In Planta, Agrobacterium mediated gene transfer by integration of adult *Arabidopsis thaliana* plants." *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-1199.
- Bellaoui, M., G. Pelletier and F. Budar (1997). "The steady-state level of mRNA from the Ogura cytoplasmic male sterility locus in *Brassica* cybrids is determined post-transcriptionally by its 3' region." *EMBO J.* 16(16): 5057-5068.
- Bonhomme, S., F. Budar, D. Lancelin, I. Small, M.-C. Defrance and G. Pelletier (1992). "Sequence and transcript analysis of the *Nco2.5* Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids." *Mol Gen Genet* 235: 340-348.
- Boutry, M. and N.-H. Chua (1985). "A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*." *EMBO J.* 4: 340-342.
- Budar, F., P. Touzet and R. de Paepe (2003). "The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited." *Genetica* 117: 3-16.
- Cartea, M. E., M. Migdal, A. M. Galle, G. Pelletier and P. Guerche (1998). "Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed." *Plant Science* 136: 181-194.
- Chaumont, F., B. Bernier, R. Buxant, M. E. Williams, C. S. Levings, 3rd and M. Boutry (1995). "Targeting the maize T-urf13 product into tobacco mitochondria confers methomyl sensitivity to mitochondrial respiration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1167-71.
- Christianson, T. R., R. Sikorski, M. Dante, J. Schero and P. Hieter (1992). "Multifunctional yeast high copy-number shuttle vectors." *Gene* 110: 119-122.
- Dewey, R. E., J. N. Siedow, D. H. Timothy and C. S. I. I. I. Lewings (1988). "A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin." *Science* 239: 293-294.
- Dimmer, K., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert and B. Westermann (2002). "Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 13: 847-853.
- Douce, R., E. L. Christensen and W. D. Bonner, Jr. (1972). "Preparation of intact plant mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 275(2): 148-60.
- Duby, G., M. Oufattole and M. Boutry (2001). "Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import." *Plant J* 27(6): 539-49.
- Farineau, J., L. Pascal and G. Pelletier (1990). "Study of respiratory and photosynthetic activities in several cytoplasmic hybrids of rapeseed with cytoplasmic male sterility." *Plant Physiol Biochem* 28(3): 333-342.
- Flavell, R. (1974). "A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize." *Plant Science Letters* 3: 259-263.
- Frank, S. A. (2000). "Polymorphism of attack and defense." *Trends in Ecology and Evolution* 15(4): 167-171.
- Freire, M. A., C. Tourneur, F. Granier, J. Camonis, A. El Amrani, K. S. Browning and C. Robaglia (2000). "Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E binding protein." *Plant Molecular Biology* 44(2): 129-140.
- Fujiki, Y., A. L. Hubbard, S. Fowler and P. B. Lazarow (1982). "Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 93(1): 97-102.
- Gakh, O., P. Cavadini and G. Isaya (2002). "Mitochondrial processing peptidases." *Biochim Biophys Acta* 1592(1): 63-77.

- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems and R. A. Woods (1995). "Studies on the transformation of intact cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure." *Yeast* 11: 355-360.
- Glab, N., R. P. Wise, D. R. Pring, C. Jacq and P. P. Slonimski (1990). "Expression in *Saccharomyce cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: Respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria." *Mol Gen Genet* 223: 24-32.
- Gorsich, S. W. and J. M. Shaw (2004). "The Importance of Mitochondrial Dynamics During Meiosis and Sporulation." *Mol Biol Cell*.
- Grelon, M., F. Budar, S. Bonhomme and G. Pelletier (1994). "Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* hybrids." *Mol Gen Genet* 243: 540-547.
- Guerin, B., P. Labbe and M. Somlo (1979). "Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios." *Methods Enzymol* 55: 149-59.
- Haferkamp, I., J. Hackstein, F. Voncken, G. Schmit and J. Tjaden (2002). "Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids." *Eur J Biochem* 269(13): 3172-3181.
- Hanson, M. R. and S. Bentolila (2004). "Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development." *Plant Cell* 16 Suppl: S154-69.
- Haseloff, J. and B. Amos (1995). "GFP in plants." *Trends Genet.* 11: 328-329.
- Heim, R. and R. Y. Tsein (1996). "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer." *Current Biology* 6: 178-182.
- Horn, R., J. Hustedt, A. Horstmeyer, J. Hahnen, K. Zetsche and W. Friedt (1996). "The CMS-associated 16 kDa protein encoded by *orfH522* in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasm of sunflower." *Plant Mol Biol* 30: 523-538.
- Huang, J., S.-H. Lee, C. Lin, R. Medici, E. Hack and A. M. Myers (1990). "Expression in yeast of the T-URF13 protein from Texas male-sterile maize mitochondria confers sensitivity to methomyl and to Texas-cytoplasm-specific fungal toxins." *EMBO J* 9(2): 339-347.
- Iwabuchi, M., N. Koizuka, H. Fujimoto, T. Sakai and J. Imamura (1999). "Identification and expression of the kosen radish (*Raphanus sativus* cv. Kosen) homologue of the Ogura radish CMS-associated gene, *orf138*." *Plant Mol. Biol.* 39:183-188.
- Karkhanis, Y. D., J. Y. Zeltner, J. J. Jackson and D. J. Carlo (1978). "A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria." *Anal Biochem* 85(2): 595-601.
- Kempken, F. and D. R. Pring (1999). *Plant breeding: Male sterility in higher plants-fundamentals and applications. Progress in Botany.* K. Esser. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 60: 139-166.
- Kitashiba, H., E. Kitazawa, S. Kishitani and K. Toriyama (1999). "Partial male sterility in transgenic tobacco carrying an antisense gene for alternative oxidase under the control of a tapetum-specific promoter." *Molecular Breeding* 5: 209-218.
- Korth, K. L., C. I. Kaspi, J. N. Siedow and C. S. I. Levings (1991). "URF13, a maize mitochondrial pore-forming protein, is oligomeric and has a mixed orientation in *Escherichia coli* plasma membranes." *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10865-10869.
- Korth, K. L. and C. S. I. Levings (1993). "Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae." *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3388-3392.
- Krishnasamy, S. and C. A. Makaroff (1993). "Characterization of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relationship with male sterility in Ogura radish." *Curr. Genet.* 24: 156-163.
- L'Homme, Y., R. J. Stahl, X.-Q. Li, A. Hameed and G. G. Brown (1997). "*Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the *pol* CMS-associated *orf224* gene." *Curr Genet* 31: 325-335.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Levings, C. S. I. and J. N. Siedow (1992). "Molecular basis of disease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize." *Plant Molecular Biology* 19: 135-147.



- Levings, C. S. r. (1993). "Thoughts on cytoplasmic male sterility in maize." *Plant Cell* 5: 1285-1290.
- Lin, M., D. H. Turpin and W. C. Plaxton (1989). "Pyruvate kinase isozymes from the green alga, *Selenastrum minutum*." *Arch Biochem Biophys* 269(1): 219-227.
- Linke, B., T. Nothnagel and T. Börner (2003). "Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to GLOBOSA and DEFICIENS." *Plant J* 34(1): 27-37.
- Logan, D. C. and C. J. Leaver (2000). "Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells." *J Exp Bot* 51(346): 865-71.
- Logan, D. C., I. Scott and A. K. Tobin (2003). "The genetic control of plant mitochondrial morphology and dynamics." *Plant J* 36(4): 500-9.
- Medberry, S. L., B. E. Lockhart and N. E. Olszewski (1992). "The *Commelina* yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues." *Plant Cell* 4(2): 185-92.
- Millar, A., A. Liddell and C. Leaver (2001). "Isolation and subfractionation of mitochondria from plants." *Methods Cell Biol* 65: 53-74.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures." *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakai, S., D. Noda, M. Kondo and T. Terachi (1995). "High-level expression of a mitochondrial *orf522* gene from the male-sterile sunflower is lethal to *E. coli*." *Breeding Science* 45: 233-236.
- Nivison, H. T. and M. R. Hanson (1989). "Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in petunia." *Plant Cell* 1(11): 1121-30.
- Ogura, H. (1968). "Studies on the new male sterility in japanese radish, with special references to utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds." *Mem Fac Agric Kagoshima Univ* 6: 39-78.
- Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi and J. Carson (1972). "Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane." *J Biol Chem* 247(12): 3962-72.
- Packer, L., K. Utsumi and M. G. Mustafa (1966). "Oscillatory states of mitochondria. 1. Electron and energy transfer pathways." *Arch Biochem Biophys* 117(2): 381-393.
- Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chétrit, R. Rémy, P. Rousselle and M. Renard (1983). "Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion." *Mol Gen Genet* 191: 244-250.
- Rhoads, D., C. r. Levings and J. Siedow (1995). "URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* 27(4): 437-445.
- Sabar, M., D. Gagliardi, J. Balk and C. Leaver (2003). "ORFB is a subunit of F(1)F(O)-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower." *EMBO Rep* 4(4): 1-6.
- Schnable, P. S. and R. P. Wise (1998). "The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration." *Trends in plant science* 3(5): 175-180.
- Sesaki, H. and R. E. Jensen (1999). "Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape." *J. Cell. Biol.* 147(4): 699-706.
- Tang, H. V., D. R. Pring, L. C. Shaw, R. A. Salazar, F. R. Muza, B. Yan and K. F. Schertz (1996). "Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum." *The Plant Journal* 10(1): 123-133.
- Werren, J. H. and L. W. Beukeboom (1998). "Sex determination, sex ratios, and genetic conflict." *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 233-261.
- Westermann, B. and W. Neupert (2000). "Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 16: 1421-1427.
- Wise, R. P., C. R. Bronson, P. S. Schnable and H. T. Horner (1999). "The genetics, pathology and molecular biology of T-cytoplasm male sterility in maize." *Advances in Agronomy* 65: 79-131.

Yamagishi, H. and T. Terachi (1997). "Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae.IV. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*." *Plant Breeding* 116: 323-329.

Yui, R., S. Iketani, T. Mikami and T. Kubo (2003). "Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit in anther tapetum causes male sterility." *Plant J* 34(1): 57-66.

### Figure legends

Fig. 1A Localization of ORF138 in the inner membrane of mitochondria from sterile plants.

Mitochondrial extracts were prepared from sterile plants and were fractionated. 5 mg of protein from each fraction was loaded onto an 8% acrylamide gel. Lane 1: Total mitochondrial protein extract before fractionation; lane 2: outer membrane enriched fraction (15%/32% sucrose interface) lane 3: inner membrane enriched fraction (32%/45% sucrose interface)

Numbers on the left indicate the sizes of standard low molecular weight markers (kDa).

NADH cytochrome c oxidoreductase activities and the proportion of antimycin A insensitive activity in each fraction are shown in the table. Specific activity is expressed in pmol of reduced cytochrome c / second / mg of protein

#### 1B. *In vitro* synthesized ORF138.

Polypeptides synthesized in the cell-free reaction mixture were analyzed by SDS-PAGE on a 15% acrylamide gel. The gel was placed against a phosphor screen overnight and analyzed with a phosphor-imager. Lane 1: 2.5 ml of the reaction mixture for the luciferase gene (positive control). Lane 2: 8 ml of a reaction mixture lacking DNA (negative control). Lane 3: 8 ml of a reaction mixture with pET138. Lane 4: 8 ml of the same reaction mixture, treated with 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. Numbers on the left indicate sizes of standard low molecular weight markers in kDa.

#### 1C. Oligomers of ORF138 in sterile plant mitochondria

Immunodetection of ORF138 in 5 mg (lane1), 15 mg (lane 2), 45 mg (lane 3), or 135 mg (lane 4) of mitochondrial proteins from sterile plants after gradient PAGE in non-reducing conditions (see Material and Methods). Numbers on the left indicate sizes of molecular weight marker (kDa). Roman numerals on the right indicate the level of oligomerization (I: monomer; II: dimer; III: trimer; etc.).

1D. *In vitro* synthesized truncated forms of the ORF138 protein.

Truncated forms of ORF138 and the whole protein were labeled with <sup>35</sup>S-methionine. We analyzed 0.5 ml of each reaction mixture by SDS-PAGE on a 15% acrylamide gel; the gel was placed against a phosphor screen for three days and quantified using a phosphorimager. Lane 1, reaction with pET138. Lane 2, reaction with pET(D1-43). Lane 3, reaction with pET(D58-138). Numbers on the left indicate sizes of standard low molecular weight markers in kDa.

Fig. 2. Schematic representation of the *orf138* constructs designed for bacterial expression. The parts of the *orf138* gene used in the constructs are indicated by hatched bars, with respect to the hydropathy profile of ORF138 (upper panel). The names of the corresponding plasmids are indicated on the left: pET138 designates the construct encoding the complete ORF138 protein, pET(D1-43) designates the construct encoding the hydrophilic part of the protein and pET(D58-138) designates the construct encoding the hydrophobic part of ORF138. The positions of the three cysteine residues of the protein are indicated by vertical arrows.

Fig. 3A. Growth rate of *E. coli* producing ORF138.

*E. coli* BL21(DE3)pLysS harboring pET138 or the pETC control plasmid was cultured as described in the Materials and Methods. After 4 hours, the cultures were divided in two, and IPTG (0.5 mM) was added to one of the two resulting cultures. Growth was monitored by withdrawing aliquots at various times and measuring OD at 600 nm. OD curves correspond to a mean of four independent experiments. Error bars indicate extreme values for each time point. The time point corresponding to the stage at which respiration was measured is indicated by a vertical arrow. (-) without IPTG; (+) with 0.5 mM IPTG.

3B. Growth rate of *E. coli* producing truncated forms of ORF138.

*E. coli* BL21(DE3)pLysS harboring pET138, pET(D1-43) or pET(D58-138) was cultured as described in Fig. 3A. OD curves correspond to a mean of two independent experiments and error bars indicate highest and lowest values. (-) without IPTG; (+) with 0.5mM IPTG.

Fig 4A. Immunoblot detection of the ORF138 protein and a truncated form in whole *E. coli* extracts and fractions

Whole *E. coli* extracts were prepared from cultures of BL21(DE3)pLysS harboring pET138 or pETD1-43, uninduced or induced with 0.5 mM IPTG, and subjected to PAGE on a 12% acrylamide gel. ORF138 and ORFD1-43 were immunodetected in insoluble and soluble fractions from IPTG-induced cultures.

Lane 1: whole extract of uninduced BL21(DE3)pLysS harboring pET138; lane 2: whole extract of induced BL21(DE3)pLysS harboring pET138; lane 3: insoluble fraction of cells expressing ORF138; lane 4: soluble fraction of cells expressing ORF138; lane 5: whole extract of uninduced BL21(DE3)pLysS harboring pETD1-43; lane 6: whole extract of induced BL21(DE3)pLysS harboring pETD1-43; lane 7: insoluble fraction of cells expressing ORFD1-43; lane 8: soluble fraction of cells expressing ORFD1-43.

With the exception of ORFD1-43 expressing cells, proteins were extracted from the equivalent of 0.07 OD unit of culture. As pETD1-43 was expressed much more strongly than pET138, all extracts from pETD1-43-carrying strains were diluted 1 : 50 before analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE and the whole ORF138 protein and its truncated form, ORFD1-43, were detected with purified rabbit antisera. In this experiment, we detected dimeric and, in some cases, oligomeric forms of the two proteins (see lanes 2 and 7), but not monomeric forms. Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

#### 4B. Intracellular localization of ORF138 in *E. coli*

Coomassie blue staining (left panel) and immunodetection of ORF138 (right panel). *E. coli* extracts were fractionated and 50 ml of each fraction was subjected to PAGE on a 12% acrylamide gel. Lane 1: total extract, lane 2: soluble fraction without treatment, lanes 3 to 6: treatment of insoluble fraction, lane 3: supernatant after detergent treatment (0.5% n-dodecyl-b D-maltoside), lane 4: insoluble fraction (pellet) after detergent treatment (0.5% n-dodecyl-b D-maltoside), lane 5: soluble fraction after urea (8 M) treatment, lane 6: insoluble fraction (pellet) after urea (8 M) treatment. Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

#### 4C. Fractionation of *E. coli* membranes and localization of ORF138.

Immunodetection (left panel) of ORF138 in *E. coli* membranes. Membranes were lysed using a French press and fractionated on a stepped sucrose gradient. Fractions (24 mg of protein) were then subjected to PAGE on an 8% acrylamide gel. . Lane 1: total membrane extract before fractionation; lane 2: fraction collected at the 45/68 interface (outer membrane); lane 3: the 45 % sucrose layer (inner membrane). Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

The KDO and NADH oxidase activities of each fraction are shown in the table. Numbers correspond to the fractions in left panel. The specific activity of NADH oxidase is expressed in mmol of substrate/minute/mg of proteins. The amount of KDO is expressed in mg per 100 mg of proteins.

#### 4D. Alkaline carbonate treatment of the inner membrane of *E. coli*.

Immunodetection of ORF138 in the supernatant (lane 1) and pellet (lane 2) after alkaline carbonate treatment of the inner membrane fraction (lane 3 of Fig. 4C) of pET138 transformants. For each fraction, 5 mg of proteins were loaded onto a 15% acrylamide gel. Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

Fig. 5A. Sequence alignment of mitochondrial (wild type) and "nuclear" (synthetic) *orf138* genes. *orf138* is the mitochondrial gene, whereas *orf138n* has been modified to resemble a nuclear gene, as described in Materials and Methods, to optimize nuclear expression. Substituted nucleotides are indicated in bold and the putative polyadenylation signal (AATAAA) is underlined. The peptide sequence of ORF138 is given below in one letter code.

5B. Schematic representation of the *orf138* constructs designed for expression in *S. cerevisiae*.

The various genes were inserted into the pRS426Met expression vector. The *orf138n* coding sequence is represented by hatched bars, the gene encoding GFP(S65T) is represented by white rectangles and the *preb* mitochondrial targeting sequence is represented by black rectangles. The names of the plasmids are indicated on the left: *preb-gfp* encodes GFP(S65T), *preb-orf138n-gfp* encodes the ORF138-GFP fusion protein and *preb-orf138n* encodes ORF138.

Fig 6. Confocal microscopy of yeast cells producing GFP and ORF-138-GFP targeted to mitochondria.

The results of our analysis of the confocal images are shown in table 2. A and C are transmission view images and correspond to the fluorescence view images shown in B and D, respectively. A, B: Yeast cells producing *preb*-GFP; C, D: Yeast cells producing *preb*-ORF138-GFP. Scale bar = 20mm.

Fig 7. Immunodetection of ORF138, GFP, and the ORF138-GFP fusion protein in *S. cerevisiae*, using antibodies directed against ORF138 or GFP.

7A Detection of GFP, ORF138 or the ORF138-GFP fusion protein in total extracts of *S. cerevisiae*.

Extracts equivalent to 1.1 OD units of culture were loaded onto a 10% acrylamide gel.

Lanes 1, 3, and 5 contain protein extracts from repressed cells whereas lanes 2, 4 and 6 contain protein extracts from not repressed cells.

Lanes 1 and 2: extracts from *preb-gfp* harboring cells.

lanes 3 and 4: extracts from *preb-orf138n* harboring cells

lanes 5 and 6: extracts from *preb-orf138n-gfp* harboring cells.

Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa). Two identical gels were processed in parallel and the corresponding membranes hybridized with antibodies directed against GFP (left panel) or ORF138 (right panel). Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

7B. Carbonate treatment of mitochondrial membranes from yeast cells producing ORF138

Proteins (6 mg) from the soluble and insoluble fractions of carbonate-treated total mitochondrial extracts were analyzed by PAGE on an 8% acrylamide gel followed by detection with purified anti-ORF138 antibodies (lanes 1 to 3) or anti-porin antibodies (lanes 4 to 6).

Lanes 1 and 4: whole mitochondrial proteins

Lanes 2 and 5: soluble fraction after carbonate treatment

Lanes 3 and 6: insoluble fraction after carbonate treatment.

Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

7C. Carbonate treatment of mitochondrial membranes from yeast cells producing ORF138-GFP

Proteins (6 mg) from the soluble and insoluble fractions from carbonate-treated total mitochondrial extracts were analyzed by PAGE on an 8% acrylamide gel followed by detection with purified anti-ORF138 antibodies (lanes 1 to 3), anti-GFP antibodies (lanes 4 to 6), or anti-porin antibodies (lanes 7 to 9).

Lanes 1, 4 and 7: whole mitochondrial proteins

Lanes 2, 5 and 8: soluble fraction after carbonate treatment

Lanes 3, 6 and 9: insoluble fraction after carbonate treatment.

Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

#### 7D. Fractionation of mitochondria from yeast cells producing ORF138

Mitochondria were subjected to fractionation and 5 mg of protein from total mitochondrial extracts and inner and outer enriched fractions were analyzed by PAGE on an 8% acrylamide gel followed by detection with purified anti-ORF138 antibodies (lanes 1 to 3), anti-ferrochelatase antibodies (lanes 4 to 6) or anti-porin antibodies (lanes 7 to 9).

Lanes 1, 4 and 7: whole mitochondrial protein extracts

Lanes 2, 5 and 8: inner membrane enriched fraction

Lanes 3, 6 and 9: outer membrane enriched fraction

Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

#### 7E. Fractionation of mitochondria from yeast cells producing ORF138-GFP

Mitochondria were subjected to fractionation and 5 mg of protein from total mitochondrial extracts and inner and outer enriched fractions were analyzed by PAGE on an 8% acrylamide gel. Proteins were detected with purified anti-ORF138 antibodies (lanes 1 to 3), anti-GFP antibodies (lanes 4 to 6), anti-ferrochelatase antibodies (lanes 7 to 9) or anti-porin antibodies (lanes 10 to 12).

Lanes 1, 4, 7 and 10: whole mitochondrial protein extracts

Lanes 2, 5, 8 and 11: inner membrane enriched fraction

Lanes 3, 6, 9 and 12: outer membrane enriched fraction

Numbers on the left indicate sizes of molecular weight markers (kDa).

Fig.8 Fluorescence of plant cells producing preb-GFP, preb-ORF138 and preb-ORF138-GFP fusion proteins

A, B, C: Transient expression in onion epidermal cells

8A: Production of preb-GFP

8B: Production of preb-ORF138-GFP

8C: Co-production of preb-GFP and preb-ORF138

Scale bar = 50mm

D, E, F, G: Stable expression *Arabidopsis* plants.

8D: Leaf trichome of a transgenic plant producing preb-GFP

8E: Same image as in 8D, but with enhanced contrast

8F Leaf trichome of a transgenic plant producing preb-ORF138-GFP

8G Same image as in 8F, but with enhanced contrast.

Scale bar = 50mm

numéro de figure article plant physiology	numéro de figure thèse
1 A	Tableau 1 + figure 31
1 C	41 A
2	22
3	21
5	46
6 B	34
6 C	35
6 D	36
6 E	37
7 ABC	47 ABC
7 DEFG	48 ABCD



**Table 1: Respiration measurements in *E. coli* cells.**

O <sub>2</sub> consumption (mmolO <sub>2</sub> .cell <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	BL21(pLys) PETC		BL21(pLys) PETORF138	
	without IPTG	with IPTG	without IPTG	with IPTG
at induction	1.3+/-0.1 x10 <sup>-12</sup>		1.8 +/-0.15 x10 <sup>-12</sup>	
2 hours after induction	1.6+/-0.1x10 <sup>-12</sup>	1.4+/-0.2x10 <sup>-12</sup>	1.9+/-0.2 x10 <sup>-12</sup>	1.8 +/-0.1 x10 <sup>-12</sup>

**Table 2: Percentage of yeast cells presenting a globular-mitochondrial phenotype when expressing preb-ORF138-GFP or preb-GFP fusions**

Construct name	% GFP expressing cells	% globular shape
Preb-GFP	15 +/- 4	10 +/- 3
Preb-ORF138-GFP	6 +/- 2	85 +/-15

Fig 1

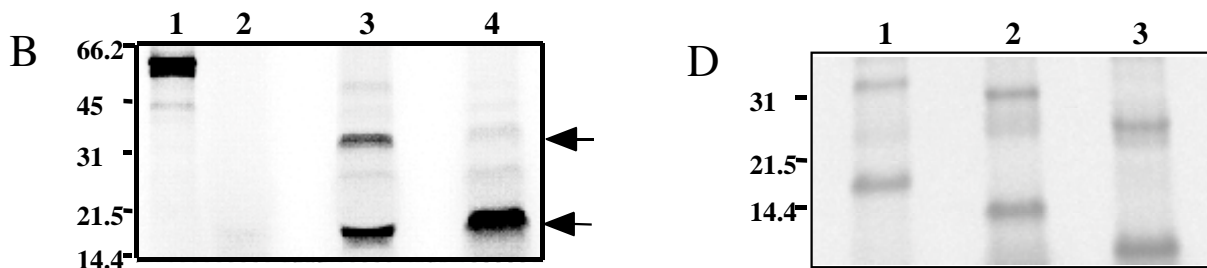


Fig. 6A

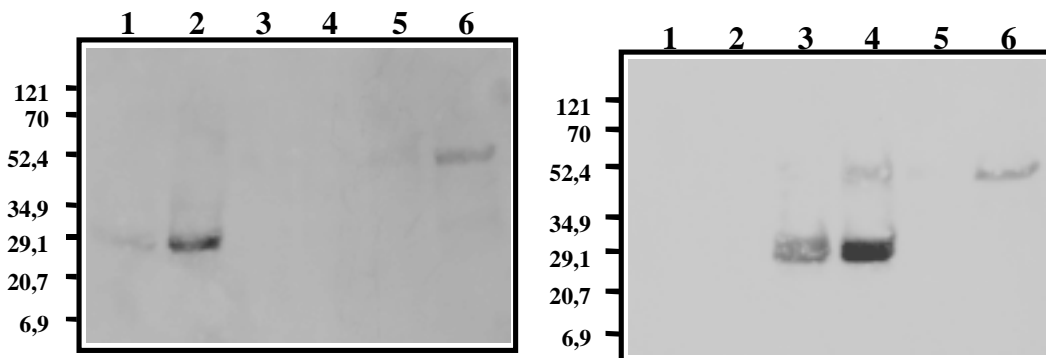
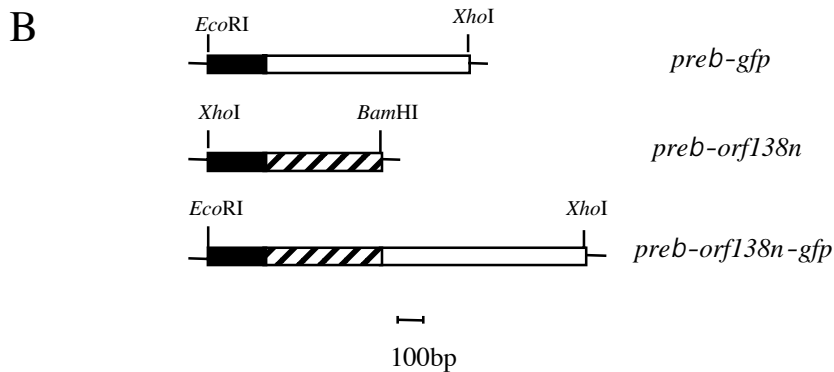


Fig. 4

**A**

orf138n	ATG ATC ACC TTC TTC GAG AAG TTG TCC ACT TTC TGC CAC AAC CTC ACC CCT
orf138	ATG ATT ACC TTT TTC GAA AAA TTG TCC ACT TTT TGT CAT AAT CTC ACT CCT
ORF138	M I T F F E K L S T F C H N L T P
orf138n	ACC GAG TGC AAG GTT AGC GTT ATC AGC TTC TTC CTT TTG GCT TTC CTT CTC
orf138	ACT GAA TGT AAA GTT AGT GTA ATA AGT TTC TTT CTT TTA GCT TTT TTA CTA
ORF138	T E C K V S V I S F F L L A F L L
orf138n	ATG GCC CAC ATC TGG CTC AGC TGG TTC TCT AAC AAC CAG CAC TGC CTT CGT
orf138	ATG GCC CAT ATT TGG CTA AGC TGG TTT TCT AAC AAC CAA CAT TGT TTA CGA
ORF138	M A H I W L S W F S N N Q H C L R
orf138n	ACC ATG AGG CAT CTA GAG AAG TTG AAG ATC CCT TAC GAG TTC CAG TAC GGA
orf138	ACC ATG AGA CAT CTA GAG AAG TTA AAA ATT CCA TAT GAA TTT CAG TAT GGG
ORF138	T M R H L E K L K I P Y E F Q Y G
orf138n	TGG CTC GGT GTC AAG ATC ACT ATC AAG TCT AAC GTT CCT AAC GAT GAG GTG
orf138	TGG CTA GGT GTC AAA ATT ACA ATA AAA TCA AAT GTA CCT AAC GAT GAA GTG
ORF138	W L G V K I T I K S N V P N D E V
orf138n	ACG AAG AAG GTC TCT CCT ATC ATC AAG GGT GAG ATC GAG GGT AAG GAG GAA
orf138	ACG AAA AAA GTC TCA CCT ATC ATT AAA GGG GAA ATA GAG GGG AAA GAG GAA
ORF138	T K K V S P I I K G E I E G K E E
orf138n	AAG AAG GAA GGT AAG GGT GAG ATC GAG GGT AAG GAG GAA AAG AAG GAG GGT
orf138	AAA AAA GAG GGG AAA GGG GAA ATA GAG GGG AAA GAG GAA AAA AAA GAG GGG
ORF138	K K E G K G E I E G K E E K K E G
orf138n	AAA GGT GAG ATC GAG GGT AAG GAG GAA AAG AAG GAG GTG GAG AAC GGT CCT
orf138	AAA GGG GAA ATA GAG GGG AAA GAG GAA AAA AAA GAG GTG GAA AAT GGA CCG
ORF138	K G E I E G K E E K K E V E N G P
orf138n	AGA AAG TGA
orf138	AGA AAA TAA
ORF138	R K *



## RESUME

---

La protéine ORF138 (codée par le génome mitochondrial) est une protéine membranaire mitochondriale responsable de la stérilité mâle cytoplasmique (SMC) Ogura. Le phénotype des plantes stériles se manifeste par une dégénérescence prématurée du tapis de l'anthere alors que la protéine ORF138 est présente dans tous les tissus. Le mécanisme physiologique conduisant à la stérilité reste encore inconnu. Les objectifs du travail de thèse étaient de développer des outils moléculaires et biochimiques et de les mettre en œuvre pour obtenir des informations pertinentes sur cette protéine, et permettre l'élaboration d'hypothèses solides quant au mécanisme de stérilité mâle.

La recherche, dans la structure primaire de la protéine ORF138, de domaines essentiels a permis de dégager les résultats suivants : l'association des domaines hydrophobe et hydrophile de la protéine est indispensable à son effet ; un domaine de 15 acides aminés dont la structure secondaire est conservée entre 3 protéines de SMC non apparentées a été mis en évidence et joue également un rôle dans cet effet.

Nous avons montré que la protéine ORF138 est enchâssée dans la membrane interne mitochondriale de colza. Cette insertion s'effectue sous des formes pouvant aller du monomère à l'hexamère. Un complexe protéique de taille comprise entre 750 et 900 kDa impliquant l'ORF138 a également été identifié. Nous avons aussi prouvé que la protéine ORF138 peut être co-purifiée avec des composants nucléoprotéiques mitochondriaux de plantes mâle stériles.

Afin de déterminer l'implication de la protéine dans des processus physiologiques, nous avons comparé les niveaux d'accumulation de l'oxydase alternative dans les mitochondries de colza fertiles ou mâle stériles. Une plus forte accumulation de cette enzyme probablement accompagnée d'une activité également accrue ont été observées chez les plantes stériles. La liaison entre stress oxydant et activité oxydase alternative est bien connue, et un lien possible entre un stress oxydant et la mort prématurée du tapis constitue une des pistes les plus prometteuses pour l'élucidation du mécanisme de stérilité.

Mots clés : Stérilité mâle cytoplasmique – mitochondrie – ORF138 – oxydase alternative – stress oxydant – mort cellulaire