



# Recherche de nouveaux systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste. Caractérisation de nouvelles protéines hydrophobes.

Daphné Seigneurin-Berny

## ► To cite this version:

Daphné Seigneurin-Berny. Recherche de nouveaux systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste. Caractérisation de nouvelles protéines hydrophobes.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2000. Français. <tel-00181078>

**HAL Id: tel-00181078**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00181078>**

Submitted on 23 Oct 2007

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

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

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I  
SCIENCES & GEOGRAPHIE**

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Daphné SEIGNEURIN-BERNY**

le 13 janvier 2000

---

---

**RECHERCHE DE NOUVEAUX SYSTEMES DE TRANSPORT  
A TRAVERS L'ENVELOPPE DU CHLOROPLASTE  
CARACTERISATION DE NOUVELLES PROTEINES HYDROPHOBES**

---

---

**Directeur de thèse : Jacques Joyard  
Co-directeur de thèse : Norbert Rolland**

**COMPOSITION DU JURY :**

Roland DOUCE, *Président*  
Michel LEBRUN, *Rapporteur*  
Jean-Charles SANCHEZ, *Rapporteur*  
Hélène BARBIER-BRYGOO, *Examineur*  
Jacques JOYARD, *Examineur*  
Norbert ROLLAND, *Examineur*

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Jacques Joyard, Directeur de Recherche au CNRS pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale du Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble. Je le remercie pour l'attention avec laquelle il a suivi ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Messieurs Roland Douce, Professeur de l'Institut Universitaire de France, Michel Lebrun, Professeur à l'Université de Montpellier, Jean-Charles Sanchez, ainsi qu'à Madame Hélène Barbier-Brygoo, Directeur de Recherche au CNRS, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Norbert Rolland qui a dirigé cette étude. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils, ses discussions, son aide et son soutien.

J'associe à ces remerciements Jérôme Garin, Agnès Chapel, Myriam Ferro et Fabrice Homblé pour leur contribution à ce travail. Je remercie aussi Daniel Salvi qui a pris en charge avec succès les recherches de mutants d'*Arabidopsis*, Christophe Guérin et Ghada Ajlani qui ont travaillé sur les mutants de cyanobactéries. Merci à Albert-Jean Dorne pour ses conseils et son aide pour les purifications de lipides. Merci à Nathalie Grandvaux pour sa patience et ses précieux conseils sur l'utilisation du système baculovirus/cellules d'insecte.

J'exprime toute ma sympathie à tous les autres membres du laboratoire, pour leurs conseils, leur soutien et les moments de détente partagés.

Je remercie ma famille et mes amis qui m'ont soutenue au cours de ces années.

A mes parents

A Vivien

**INTRODUCTION - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES****LES TRANSPORTS D'IONS ET DE METABOLITES A TRAVERS L'ENVELOPPE DU CHLOROPLASTE**

1

**INTRODUCTION**

1

**I. METHODES D'ETUDE DES ACTIVITES DE TRANSPORT A TRAVERS L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES**

2

**A. Caractérisation physiologique des transports à l'aide de chloroplastes intacts**

3

1. Transport de métabolites

3

2. Patch-clamp et chloroplastes intacts

3

**B. Utilisation de vésicules d'enveloppe**

5

**C. Etude des activités de transport dans des systèmes artificiels**

5

**D. Conclusion**

6

**II. LES TRANSPORTS IONIQUES A TRAVERS L'ENVELOPPE**

6

**A. Introduction**

6

**B. Systèmes de transport d'ions caractérisés au niveau physiologique**

8

1. Les activités canal de type porine (canaux à faible sélectivité)

9

a. Caractéristiques des porines

9

b. Identification d'une porine dans les chloroplastes de l'algue verte  
*Nitellopsis obtusa*

9

c. Porine de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste de plantes  
supérieures

10

d. Porine de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste de plantes  
supérieures

10

2. Les canaux sélectifs pour les anions

11

3. Canaux sélectifs pour les cations

12

a. Canal  $K^+$ 

12

 $\alpha$ . Identification d'un canal  $K^+$ 

12

 $\beta$ . Purification partielle du canal  $K^+$ 

13

b. Canal  $Ca^{2+}$ 

13

 $\alpha$ . Mise en évidence de flux de calcium

14

 $\beta$ . Identification d'un uniport  $Ca^{2+}$ 

14

4. L'ATPase pompe à protons et les flux  $H^+/K^+$ 

14

a. ATPase pompe à protons

15

b. Les flux  $H^+/K^+$ 

15

**C. Systèmes de transport d'ions caractérisés au niveau moléculaire**

17

1.  $Ca^{2+}$ -ATPase de la membrane interne de l'enveloppe

18

2. Canal de la membrane externe sélectif pour les acides aminés (OEP16)

18

a. Approche utilisée pour la caractérisation

18

b. Caractéristiques du canal OEP16

19

3. Caractérisation d'un canal de type porine (OEP24) dans la membrane externe  
de l'enveloppe

19

a. Caractéristiques du canal OEP24	19
b. Fonction de la protéine OEP24	20
4. Conséquence de la présence des canaux OEP16 et OEP24 sur la perméabilité de la membrane externe de l'enveloppe	20
<b>D. Activité canal ionique des transporteurs de phosphate/triose phosphate (IE30) et de 2-oxoglutarate/malate (IE45)</b>	21
<b>E. Autres types de transport pouvant impliquer des mouvements d'ions</b>	22
1. Transport du sulfate et des nitrites	22
a. Transport des nitrites	22
b. Transport du sulfate	23
2. Import du CO <sub>2</sub>	23
3. Transporteurs de métaux	23
<b>III. AUTRES TYPES DE TRANSPORT A TRAVERS L'ENVELOPPE</b>	24
<b>A. Transport de métabolites</b>	24
1. Transports de métabolites couplés au transport de Pi	24
a. Le transporteur de phosphate/triose phosphate	24
b. Le transporteur de phosphate/phosphoénolpyruvate	25
c. Transporteur de glucose/phosphate	26
2. Transport d'acides dicarboxyliques	26
a. Transporteurs de 2-oxoglutarate/malate, de glutamate/malate et de glutamate/glutamine	26
b. Transport de l'oxaloacétate	27
c. Transporteur de glycérate/glycolate	27
3. Transport d'adénylate	28
4. Transport de pyruvate - Transport du pyrophosphate	28
5. Transport des acides aminés	28
6. Transport de molécules impliquées dans la synthèse des lipides	29
7. Transports divers	29
8. Conclusion	30
<b>B. Import des protéines dans le chloroplaste</b>	30
<b>IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	32
<b>MATERIEL ET METHODES GENERALES</b>	<b>41</b>
<hr/> <hr/>	
<b>I. PREPARATION DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES D'EPINARD</b>	41
<b>A. Choix du matériel végétal</b>	41
<b>B. Préparation des chloroplastes intacts</b>	41
<b>C. Traitement des chloroplastes intacts par la thermolysine</b>	42
<b>D. Purification de l'enveloppe des chloroplastes</b>	43
<b>E. Préparation de fractions d'enveloppe enrichies en membranes externe et interne</b>	43

<b>F. Préparation de noyaux à partir de jeunes feuilles d'épinard</b>	44
<b>II - TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES</b>	44
<b>A. Dosage des protéines</b>	44
<b>B. Solubilisation des protéines dans des détergents</b>	44
<b>C. Pontage chimique de protéines</b>	45
<b>D. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide</b>	45
1. Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes	45
2. Coloration d'un gel au bleu de Coomassie	45
3. Coloration d'un gel au nitrate d'argent	46
<b>E. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immunomarquage</b>	46
1. Technique de transfert	46
2. Coloration de la membrane au bleu de Coomassie pour séquençage de la partie N-terminale	47
3. Immunomarquage	47
a. Révélation par mesure de la chimiluminescence	47
b. Révélation par mesure de l'activité phosphatase alcaline	48
<b>F. Purification des immunoglobulines</b>	48
1. Purification des IgG à partir du sérum	48
2. Immunopurification des IgG spécifiques	48
<b>G. Obtention des séquences N-terminales et des séquences internes</b>	49
<b>III. TECHNIQUES D'ETUDE DES LIPIDES</b>	50
<b>A. Extraction des lipides totaux de l'enveloppe</b>	50
<b>B. Séparation des lipides par chromatographie sur couches minces</b>	50
<b>C. Purification des lipides de l'enveloppe par chromatographie sur colonne de silice</b>	50
<b>D. Dosage des chlorophylles</b>	51
<b>IV. TECHNIQUES D'ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES</b>	51
<b>A. Techniques d'analyse de l'ADN</b>	51
1. Extraction de l'ADN total	51
2. Extraction de l'ADN chloroplastique	52
3. Extraction de l'ADN nucléaire	52
4. Extraction de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose	52
5. Synthèse d'oligonucléotides	52
6. Amplification <i>in vitro</i> de fragments d'ADN	52
7. Techniques d'hybridation	53
a. Marquage de l'ADN double brin	53
b. Marquage des oligonucléotides	53
c. Transfert de l'ADN sur membrane de nylon	53
d. Préhybridation, hybridation et rinçages	54

8. Technique de séquençage de l'ADN	54
<b>B. Techniques de criblage d'une banque d'ADNc dans <math>\lambda</math>gt11 à l'aide d'anticorps ou d'une sonde nucléique</b>	55
1. Titration de la banque d'ADNc	55
2. Criblage de la banque d'ADNc	55
a. Utilisation d'anticorps polyclonaux	55
b. Utilisation d'une sonde nucléique	56
<b>V. TECHNIQUES D'EXPRESSION PROCARYOTE</b>	56
<b>A. Principe de la surexpression chez <i>Escherichia coli</i></b>	56
<b>B. Construction des vecteurs d'expression procaryote</b>	57
1. Construction des plasmides recombinants	57
2. Préparation de l'ADN des plasmides	58
<b>C. Préparation et transformation des bactéries compétentes</b>	58
1. Méthode utilisant le traitement au $\text{CaCl}_2$	58
2. Technique d'électroporation	59
<b>D. Conditions d'expression</b>	59
<b>E. Technique de purification des protéines recombinantes contenant une extension N-terminale poly-histidine</b>	59
1. Préparation des protéines	59
2. Préparation de la colonne	60
3. Chromatographie d'affinité	60
<b>VI. TECHNIQUES D'EXPRESSION EUCARYOTE</b>	60
<b>A. Description du système cellules d'insecte/baculovirus</b>	60
<b>B. Production de baculovirus recombinants</b>	61
<b>C. Protocoles expérimentaux utilisés</b>	62
1. Milieu et lignée cellulaire	62
2. Culture	62
a. Comptage des cellules	62
b. Culture de cellules en monocouche	62
c. Culture de cellules en suspension	62
d. Congélation/décongélation des cellules <i>Sf9</i>	63
3. Clonage de l'ADNc dans le vecteur de transfert	63
4. Transfert de l'ADNc dans le génome du baculovirus	63
5. Purification du virus recombinant	64
6. Amplification des stocks de virus	66
a. Première amplification	66
b. Préparation d'un stock de virus à haut titre	67
c. Détermination du titre du virus	67
7. Production de protéines recombinantes	67
a. Optimisation de l'expression de protéines recombinantes	67
b. Production en masse de protéines recombinantes	68



**CHAPITRE I**  
**UNE APPROCHE PROTEOMIQUE SUBCELLULAIRE**  
**SPECIFIQUE POUR IDENTIFIER LES PROTEINES**  
**HYDROPHOBES RARES** 69

---

<b>I. EXTRACTION DES PROTEINES HYDROPHOBES DE L'ENVELOPPE</b> <b>DANS DES MELANGES CHLOROFORME/METHANOL</b>	71
A. Protocole d'extraction des protéines dans des solvants organiques	71
B. Analyse des protéines extraites dans des mélanges de solvants organiques	71
C. Optimisation de la technique d'extraction des protéines hydrophobes	73
D. Détermination des conditions de sélection des protéines les plus hydrophobes	73
<b>II. CARACTERISATION DES PROTEINES HYDROPHOBES EXTRAITES</b> <b>DANS DES MELANGES DE CHLOROFORME/METHANOL</b>	74
A. Criblage d'une banque d'expression à l'aide d'anticorps polyclonaux	74
B. Analyse par microséquençage des protéines de l'enveloppe solubles dans le chloroforme/méthanol	75
1. Protéines déjà caractérisées	77
2. Identification de nouvelles protéines	78
<b>III. CONFIRMATION DE L'IDENTITE DES PROTEINES D'EPINARD ET</b> <b>D'ARABIDOPSIS : L'EXEMPLE DE IE18</b>	82
A. Clonage de l'ADNc et du gène codant la protéine IE18 d'épinard	82
B. Clonage de l'ADNc codant la protéine IE18 d'épinard par 3' et 5' RACE	83
<b>IV. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES POLYPEPTIDES DE</b> <b>16, 18 ET 41 KDA</b>	87
A. Obtention d'anticorps polyclonaux	87
B. Localisation des protéines identifiées dans le chloroplaste	87
<b>V. RELATION ENTRE L'HYDROPHOBICITE DES PROTEINES ET LEUR</b> <b>SOLUBILISATION DANS DES SOLVANTS OU DES DETERGENTS</b>	89
A. Extraction dans les solvants organiques	90
B. Solubilisation dans les détergents	90
C. Conclusion	90
<b>VI. DISCUSSION – CONCLUSION</b>	92
A. Le traitement des membranes de l'enveloppe des chloroplastes par des mélanges chloroforme/méthanol permet d'extraire les protéines intrinsèques les plus hydrophobes	92
B. L'extraction des protéines hydrophobes par le chloroforme/méthanol est bien adaptée au microséquençage des protéines	92
C. Une approche protéomique spécifique de la localisation subcellulaire	93

## CHAPITRE II

### VERS LA CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE IE16 ET IE18, PROTEINES HYDROPHOBES DE L'ENVELOPPE 95

---

<b>I. RECHERCHE DE PROTEINES HOMOLOGUES AUX PROTEINES IE16 ET IE18</b>	96
<b>A. Les homologues de IE16</b>	96
<b>B. Les homologues de IE18</b>	97
<b>C. Conclusion</b>	100
<b>II. OBTENTION ET CARACTERISATION PARTIELLE DE MUTANTS DE CYANOBACTERIES ET D'ARABIDOPSIS THALIANA</b>	102
<b>A. Obtention de mutants de cyanobactéries</b>	102
1. Conditions de culture des cyanobactéries	103
2. Obtention de mutants de <i>Synechocystis</i> PCC6803 - stratégie globale	103
3. Obtention d'un mutant de la protéine de <i>Synechocystis</i> homologue de la protéine IE18	105
a. Obtention des mutants	105
b. Analyse du phénotype des mutants	106
c. Discussion	106
4. Conclusion	108
<b>B. Obtention de mutants d'<i>Arabidopsis thaliana</i></b>	109
1. Principe de la production de mutants d'insertion	109
2. Criblage de la banque d'insertion	110
a. Principe du criblage	110
b. Choix des amorces	111
3. Criblage de la banque d'insertion pour l'identification de mutants du gène <i>ie18</i>	112
4. Criblage de la banque d'insertion pour l'identification de mutants du gène <i>ie16-1</i>	118
5. Analyse du phénotype des mutants	118
a. Culture des plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
α. Préparation des graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et semis sur milieu nutritif solide	118
β. Culture en phytotron	120
b. Obtention des plantes homozygotes pour le gène interrompu	120
c. Analyse des plantes mutantes	121
α. Plantes mutantes pour le gène <i>ie16-1</i>	121
β. Mutation dans le gène codant IE18	122
6. Conclusion	122
<b>III. SUREXPRESSION DES PROTEINES DANS DES SYSTEMES HETEROLOGUES</b>	125
<b>A. Surexpression des protéines IE18, IE16-1, p16-2 d'<i>A. thaliana</i> et ORF 229 de tabac dans un système d'expression eucaryote</b>	125
1. Construction des plasmides	125
2. Surexpression des protéines IE18, IE16, p16-2 et ORF229	127

<b>B. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes</b>	129
1. Expériences de pontage chimique	129
2. Réduction des ponts disulfure	130
3. Mesures d'activité canal ionique après insertion dans des bicouches lipidiques planes	130
<b>IV. CONCLUSION</b>	131

## CHAPITRE III

<b>ETUDE DE L'INTERACTION DE L'ANNEXINE AVEC LE CHLOROPLASTE</b>	133
------------------------------------------------------------------	-----

---

<b>I. CARACTERISATION DE L'ANNEXINE ASSOCIEE A L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES</b>	134
<b>A. Identification d'une annexine dans l'enveloppe des chloroplastes d'épinard</b>	134
<b>B. Production de l'annexine chez <i>Escherichia coli</i></b>	135
1. Surexpression de l'annexine chez <i>E. coli</i>	135
2. Test de fonctionnalité de la protéine recombinante	138
<b>C. Purification de l'annexine native à partir de feuilles et de tiges d'épinard</b>	139
1. Protocole de purification de l'annexine	139
2. Analyse des protéines obtenues par purification	141
<b>II. INTERACTION DE L'ANNEXINE AVEC LES CHLOROPLASTES</b>	141
<b>A. Analyse de la fixation de l'annexine avec les différents lipides de l'enveloppe</b>	141
1. Purification des lipides	141
2. Protocole utilisé pour analyser l'interaction de l'annexine avec les différents lipides de l'enveloppe	141
3. Détermination de la nature des lipides de l'enveloppe susceptibles d'interagir avec l'annexine	142
<b>B. L'annexine se fixe à l'enveloppe du chloroplaste en présence de calcium</b>	143
1. L'annexine copurifiée avec le chloroplaste et l'enveloppe préparés en présence de calcium	143
a. Protocole utilisé pour éluer l'annexine à partir des chloroplastes	143
b. Protocole utilisé pour éluer l'annexine à partir de l'enveloppe	143
c. Analyse des éluions de l'annexine à partir des chloroplastes et de l'enveloppe	143
2. Fixation <i>in vitro</i> de l'annexine sur des chloroplastes purifiés	145
a. Protocole pour analyser l'interaction de l'annexine avec des chloroplastes intacts et purifiés	145
b. Analyse de l'interaction <i>in vitro</i> de l'annexine avec des chloroplastes purifiés	146
c. Agrégation de chloroplastes intacts par l'annexine	147

<b>III. RECHERCHE DU ROLE DE L'ANNEXINE ASSOCIEE A L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES</b>	<b>148</b>
1. Impact de l'annexine sur la photosynthèse	148
2. L'annexine peut-elle former des canaux ioniques ?	148
3. L'annexine a-t-elle une activité de type peroxydase ?	149
a. Mesure de l'activité peroxydase	149
b. Analyse des mesures d'activité peroxydase	150
<b>IV. DISCUSSION – CONCLUSION</b>	<b>152</b>
<b>A. L'annexine cytosolique de feuilles d'épinard se lie au chloroplaste</b>	<b>152</b>
<b>B. L'annexine peut se fixer sur le sulfoquinovosyldiacylglycérol, un glycolipide spécifique des plastes</b>	<b>153</b>
<b>C. Quel rôle pour l'annexine dans le chloroplaste ?</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>159</b>
<hr/> <hr/>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>165</b>
<hr/> <hr/>	
<b>ANNEXES</b>	<b>179</b>
<hr/> <hr/>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Multi Nuclear Polyhedrosis Virus
ADP (ATP)	Adénosine 5'-di(tri)phosphate
ADN (ADNc)	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
ADN-T	ADN de Transfert
ARNm (ARNt)	Acide ribonucléique messenger (de transfert)
ANS	Acide 8 anilino-naphtalène sulfonique
APG	Acide 3-phosphoglycérique
APMB	2-(4-aminophenyl)-6-méthylbenzothiazole
Asp	Aspartate
BCIP	5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BS <sup>3</sup>	Bis (sulfosuccinimidyl) subérate
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DIDS	4, 4'-disothiocyantstilbène-2-2'-disulfonique acide
DCCD	<i>N, N'</i> dicyclohexylcarbodiimide
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DO	Densité optique
DPG	Diphosphatidylglycérol
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
EST	Expressed sequence tag
Glu	Glutamate
Gln	Glutamine
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
HEPES	Acide <i>N</i> -2-hydroxyéthylpipérazine- <i>N'</i> -2-éthanesulfonique
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb (pb)	Kilopaire de bases (paire de bases)
kDa	Kilo Dalton
Lys	Lysine
Mal	Malate
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MOI	Multiplicity of Infection
MOPS	Acide 3-( <i>N</i> -morpholino) propane sulfonique
NEM	<i>N</i> -éthylmaléimide
<i>N</i> -terminal	Amino terminal
NBT	Nitro-bleu de tétrazolium
nt	Nucléotide
OAA	Oxaloacétate
2-OG	2-oxoglutarate
PA	Acide phosphatidique
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline

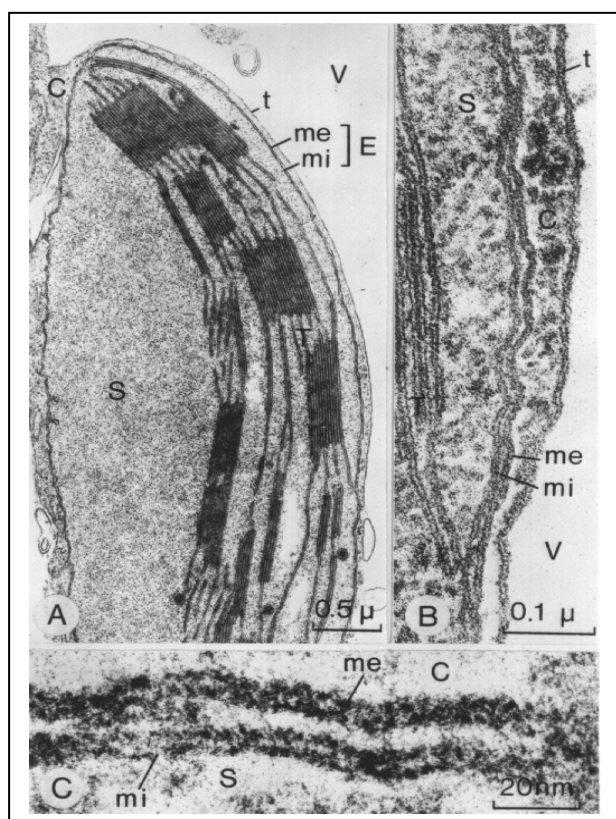
## Sommaire

PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
Pi	Phosphate inorganique
pI	Point isoélectrique
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
POPS	1-palmitoyl-2 oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphosérine
PPi	Pyrophosphate
PS	Phosphatidylsérine
RNAse	Ribonucléase
SAB	Sérum Albumine Bovine
SAM	<i>S</i> -adénosylméthionine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
TBS	Tris Buffer Saline
TEA	Tétraéthylammonium
TM	Transmembranaire
Triose P	Triose phosphate
Tris	Acide <i>N</i> -tris(hydroxyl)méthyl-2-aminoéthane sulphonique
TTX	Tétrodotoxine
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## LES TRANSPORTS D'IONS ET DE METABOLITES A TRAVERS L'ENVELOPPE DU CHLOROPLASTE

### INTRODUCTION

Les plastes de végétaux supérieurs sont limités par une enveloppe constituée de deux membranes distinctes (figure 1) ; c'est la seule structure membranaire permanente des plastes. D'une part, elle est toujours présente lors de la transformation des proplastés en plastes différenciés (chloroplastes, amyloplastés, chromoplastes et étioplastes). D'autre part, lors de la division cellulaire, les plastes - et donc leur enveloppe limitante - se transmettent d'une génération de cellules à la suivante (Douce & Joyard, 1990).



*Figure 1. Observation en microscopie électronique de l'enveloppe de chloroplastes d'épinard à différents grossissements. L'enveloppe est formée de deux membranes distinctes qui se colorent avec la même intensité. A fort grossissement et après traitement à l'acide tannique, la structure tripartite de chaque membrane est bien visible (Carde *et al.*, 1982). C : cytosol. S : stroma, V : vacuole, E : enveloppe, T : thylacoïdes, me : membrane externe, mi : membrane interne, t : tonoplaste.*

Les chloroplastes possèdent des fonctions qui leur sont spécifiques comme la photosynthèse. Ils sont impliqués dans la synthèse des acides aminés, des acides gras et dans la formation de nombreux composés secondaires formés à partir de la voie du shikimate.

La localisation de l'enveloppe à l'interface entre le cytosol et le plaste en fait le site privilégié des interactions entre ces deux compartiments. Les membranes de l'enveloppe sont le site de transport de métabolites, de protéines, et d'information entre les plastes et les autres compartiments. Ainsi, le développement des plastes implique le fonctionnement coordonné de

deux génomes : le génome plastidial et le génome nucléaire. La plupart des protéines du plaste sont codées par le génome nucléaire et doivent donc traverser l'enveloppe par un mécanisme d'import des protéines (pour revue voir Heins *et al.*, 1998). D'autre part, l'enveloppe catalyse la biosynthèse de nombreux constituants spécifiques du plaste (Joyard *et al.*, 1998) : lipides membranaires (galactolipides, sulfolipide...), prénylquinone (plastoquinone,  $\alpha$ -tocophérol), pigments (caroténoïdes, précurseurs de la chlorophylle) (pour revue voir Douce & Joyard, 1990). La membrane interne de l'enveloppe renferme une grande variété de transporteurs qui catalysent des échanges de métabolites entre stroma et cytosol (Heber & Heldt, 1981). Ainsi, le carbone fixé pendant la journée est exporté hors des chloroplastes, via le transporteur de phosphate/triose phosphate, vers le cytosol où il est converti en saccharose et redistribué dans la plante. L'enveloppe des chloroplastes intervient donc dans la régulation de nombreux processus métaboliques comme la photosynthèse et la photorespiration. De fait, chacune des membranes contient différentes protéines et divers systèmes de transport qui régulent l'échange de métabolites à travers l'enveloppe. Les deux membranes de l'enveloppe diffèrent donc par leur structure, leurs fonctions et leurs propriétés biochimiques mais coopèrent notamment pour la synthèse de lipides ou pour l'importation des protéines codées par le génome nucléaire.

Dans ce chapitre, nous décrivons les activités de transport identifiées à travers l'enveloppe du chloroplaste, ainsi que la caractérisation moléculaire de certains transporteurs. Le schéma présenté dans la figure 2 résume les différents transports répertoriés à travers l'enveloppe du chloroplaste. Ce schéma montre un ensemble de systèmes de transport très complexe. De nombreuses activités de transport ont été détectées, cependant très peu de transporteurs ont été caractérisés au niveau moléculaire. Notamment, les transporteurs de phosphate/triose phosphate et d'oxoglutarate/malate sont les deux seuls transporteurs de l'enveloppe totalement caractérisés au niveau physiologique, biochimique et moléculaire. Un aperçu des caractéristiques de ces systèmes de transport est donné à la fin de ce chapitre (voir pp. 36-40).

## **I. METHODES D'ETUDE DES ACTIVITES DE TRANSPORT A TRAVERS L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES**

Le métabolisme des plastes, totalement intégré à celui de la cellule, implique l'existence de divers mécanismes de transport de solutés à travers l'enveloppe pour fournir à la cellule l'azote organique, les composés soufrés et les carbohydrates. Les plastes doivent importer et/ou exporter des cations ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ...), des anions ( $NO_2^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$ ...) et une grande variété de métabolites, impliqués dans les voies biosynthétiques, comme les trioses phosphate, les acides dicarboxyliques, l'acétate, les acides aminés et l'ATP. Ainsi, de nombreux systèmes de transports doivent exister dans l'enveloppe du chloroplaste. La majorité d'entre eux a été identifiée par des travaux réalisés sur des chloroplastes isolés.



Quelques études ont été effectuées directement sur des vésicules d'enveloppe isolée. Enfin, l'utilisation de systèmes artificiels (liposomes, bicouches lipidiques planes...) dans lesquels des protéines ont été insérées, a permis la caractérisation d'activité de type canal ionique ou de confirmer la fonction de quelques protéines purifiées à partir d'enveloppe.

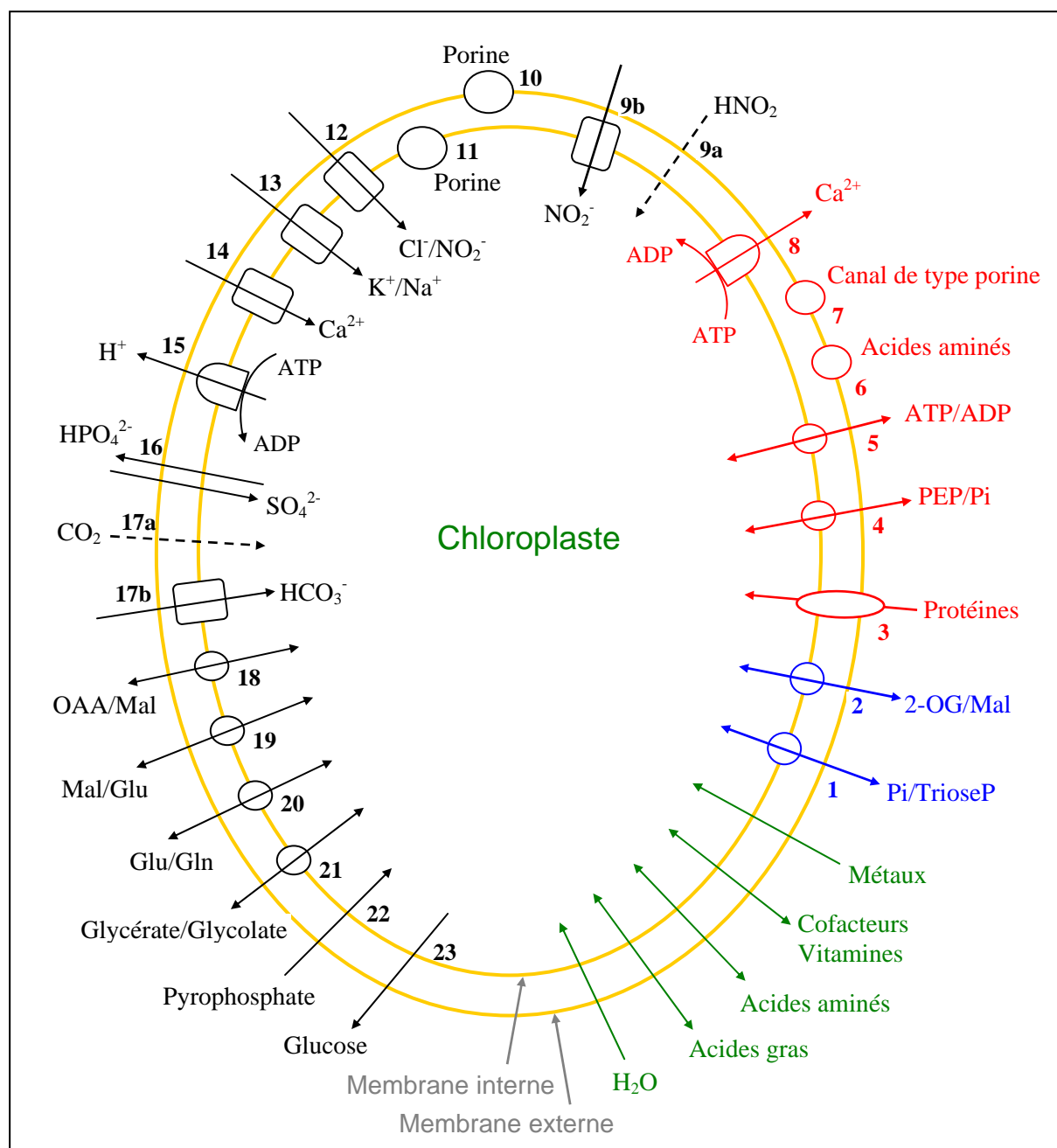
## **A. Caractérisation physiologique des transports à l'aide de chloroplastes intacts**

### **1. Transport de métabolites**

C'est grâce à la préparation de chloroplastes intacts qu'il a été possible de caractériser physiologiquement des activités de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste (Krause & Heber, 1976 ; Heldt, 1976), en particulier grâce à la technique de centrifugation par filtration sur huile de silicone (Heldt, 1980). Cette technique permet d'analyser directement l'import d'une molécule donnée (en général radioactive) dans les chloroplastes et de déterminer les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) du transport. Ces expériences ont permis de montrer que les deux membranes de l'enveloppe ont une perméabilité différentielle (Heldt et Rapley, 1970) et de préciser les caractéristiques d'import de nombreux métabolites (phosphate, triose phosphate, acides dicarboxyliques, etc...). L'avantage de cette approche est de permettre l'analyse de l'import ou de l'efflux de molécules d'intérêt physiologique (impliquées dans la photosynthèse, par exemple). Il est aussi possible d'étudier l'impact de substances inhibitrices sur le fonctionnement de chloroplastes intacts (mesure de la photosynthèse, du pH du stroma, des concentrations d'ions dans le stroma). Par contre, il est impossible avec cette méthode d'obtenir des renseignements sur la nature moléculaire du système de transport. L'importance de cette stratégie est illustrée dans la figure 2 : la majorité des activités de transport connues sur l'enveloppe des chloroplastes a été identifiée grâce à cette approche.

### **2. Patch-clamp et chloroplastes intacts**

Le patch-clamp est une méthode de choix pour étudier la nature et le fonctionnement des canaux ioniques au sein des membranes (voir par exemple Barbier-Brygoo *et al.*, 1991). En effet, il est possible, dans certains cas, de mesurer l'activité d'un seul canal. De plus, l'environnement immédiat des protéines est préservé, de même que leur orientation. Enfin, il est facile de maîtriser la nature du milieu de part et d'autre de la membrane à analyser. Cependant, dans le cas des chloroplastes, le problème est rendu particulièrement difficile pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la taille des chloroplastes (10  $\mu m$  de diamètre) se prête assez mal à l'implantation d'une micropipette. D'autre part, la caractérisation de systèmes de transport localisés (*a priori*) sur la membrane interne de l'enveloppe est rendue délicate par la présence de la membrane externe. Pourtant quelques rares publications font état de travaux. Elles proviennent toutes du même groupe qui semble avoir réussi à maîtriser les conditions expérimentales pour caractériser des canaux ioniques dans l'enveloppe de chloroplastes aussi variés que ceux de *Chara*, *Amaranthus* ou *Zea mays* (voir par exemple Pottosin, 1992).



**Figure 2. Schéma récapitulatif des flux de matière et d'ions à travers l'enveloppe du chloroplaste.**

Les activités de transport identifiées au niveau physiologique sont indiquées en noir. Les activités identifiées au niveau moléculaire sont indiquées en rouge. Les activités de transport déduites des voies métaboliques existant dans le chloroplaste sont marquées en vert. Les 2 transporteurs indiqués en bleu sont les seuls totalement caractérisés au niveau physiologique, biochimique et moléculaire.

1 : Transporteur de Phosphate/Triose Phosphate (IE30) (Flügge *et al.*, 1989). 2 : Transporteur de 2-oxoglutarate/malate (IE45) (Weber *et al.*, 1995). 3 : Import des protéines (Gray & Row, 1995, Schnell, 1995). 4 : Transporteur de Phosphate/Phosphoénolpyruvate (Fischer *et al.*, 1994 ; Fischer *et al.*, 1997). 5 : Transporteur ATP/ADP (Neuhaus *et al.*, 1997). 6 : Canal sélectif pour les acides aminés (OEP16) (Pohlmeier *et al.*, 1997). 7 : Canal de type porine (OEP24) (Pohlmeier *et al.*, 1998). 8 :  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Huang *et al.*, 1993). 9a : Diffusion du  $\text{HNO}_2$  (Shingles *et al.*, 1996). 9b. Transporteur de  $\text{NO}_2^-$  (Brunswick & Cresswell, 1988a, 1988b). 10 : Porine de la membrane externe (Flügge & Benz, 1984 ; Pottosin, 1992). 11 : Porine de la membrane interne (Fuks & Homblé, 1995 ; Heiber *et al.*, 1995). 12 :

Canal anionique Cl<sup>-</sup> (Heiber *et al.*, 1995 ; Fuks & Homblé, 1999). 13 : Canal cationique K<sup>+</sup> (Wu & Berkowitz, 1992, 1993 ; Mi *et al.*, 1994 ; Heiber *et al.*, 1995). 14 : Uniport Ca<sup>2+</sup> (Kreimer *et al.*, 1985 ; Roh *et al.*, 1998). 15 : H<sup>+</sup>-ATPase (Douce *et al.*, 1973 ; Wu & Berkowitz, 1992, 1992b ; Shingles & Mc Carty, 1994). 16 : Transport de sulfate/phosphate (Mourieux & Douce, 1978). 17a : Diffusion passive du CO<sub>2</sub>. 17b : Transport du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> détecté dans les chloroplastes de *Chlamydomonas* (Rolland *et al.*, 1997). 18 : Transporteur d'oxaloacétate/malate (Hatch *et al.*, 1984). 19 : Transporteur de glutamate/malate (Woo *et al.*, 1987). 20 : Transporteur de glutamate/glutamine (Yu & Woo, 1988). 21 : Transporteur de glycérate/glycolate (Howitz & Mc Carty, 1985). 22 : Transporteur de pyrophosphate (Lunn & Douce, 1993). 23 : Transporteur de glucose (Schäfer *et al.*, 1977). Pi, phosphate inorganique. TrioseP, triose phosphate. 2-OG, 2-oxoglutarate. Mal, malate. PEP, phosphoénolpyruvate. OAA, oxaloacétate. Glu, glutamate. Gln, glutamine.

## B. Utilisation de vésicules d'enveloppe

L'utilisation de vésicules isolées s'est révélée très efficace pour des études de transport à travers la membrane plasmique ou le tonoplaste (voir par exemple Gerbeau *et al.*, 1999). Dans le cas des chloroplastes, quelques travaux font état de l'utilisation de vésicules d'enveloppe, voire de préparations de vésicules de membrane interne. Ainsi, Roh *et al.* (1998) ont utilisé des vésicules de membrane interne d'enveloppe de chloroplastes de pois, chargées à l'aide du fluorophore fura-2, pour analyser (par spectrofluorimétrie) les mouvements de Ca<sup>2+</sup> et caractériser physiologiquement le système impliqué dans ce transport. C'est aussi sur des vésicules d'enveloppe isolée que les flux de K<sup>+</sup> ont été étudiés (voir par exemple Mi *et al.*, 1994). Le problème avec de telles expériences est qu'il est très difficile d'affirmer que les préparations d'enveloppe utilisées présentent la même perméabilité que la membrane interne *in vivo*. D'autre part, il est très difficile de déterminer leur orientation (face stromatique interne ou externe). De plus, lors de l'isolement des vésicules d'enveloppe, la membrane interne fusionne très facilement avec la membrane externe (Douce & Joyard, 1980), qui renferme une protéine de type porine. Enfin, il n'est pas possible d'obtenir des préparations pures de membrane interne, et les vésicules obtenues sont en fait très proches des préparations d'enveloppe totale (Cline *et al.*, 1981 ; Block *et al.*, 1983ab).

## C. Etude des activités de transport dans des systèmes artificiels

En complément de travaux réalisés sur des vésicules d'enveloppe, l'utilisation de liposomes ou de membranes artificielles permet de mieux comprendre le fonctionnement des protéines impliquées dans les flux d'ions ou de métabolites. En effet, il est possible de contrôler les solutions dans les compartiments *cis* et *trans* de part et d'autre de la membrane. D'autre part, cette technique permet l'étude de l'activité de transport supposée de protéines purifiées. Ainsi, Flügge & Heldt (1981) ont confirmé l'activité du transporteur de phosphate/triose phosphate qu'ils venaient de purifier. D'autre part, Mi *et al.* (1994) ont fusionné des vésicules d'enveloppe avec des bicouches lipidiques planes afin d'étudier les courants produits par les canaux K<sup>+</sup> de l'enveloppe. Plus récemment, des activités de type canal ionique ont été caractérisées dans la membrane externe de l'enveloppe (Polhmeyer *et al.*, 1997, 1998). Bien

que très séduisante *a priori*, cette technique de reconstitution dans des systèmes artificiels modifie considérablement l'environnement lipidique de la protéine dont on étudie la fonction. Les membranes artificielles utilisées dans ces reconstitutions présentent une composition lipidique très différente de celle de l'enveloppe. D'autre part, l'orientation de la protéine dans la membrane n'est pas contrôlée et la compartimentation présente dans le chloroplaste n'est pas retrouvée, ni les molécules qui constituent l'environnement *in vivo* de ces protéines. Ainsi, ces mesures donnent des indications sur la fonction potentielle des protéines insérées dans les protéoliposomes. Cependant, elles ne permettent pas de déterminer avec précision les conditions de transport *in vivo*. Dans de tels systèmes, les canaux ioniques présentent des propriétés parfois assez différentes de celles que l'on peut déterminer dans des systèmes moins artificiels (patch-clamp, par exemple).

## D. Conclusion

Cette brève présentation avait pour objectif de montrer qu'il n'existe pas actuellement de technique idéale pour identifier la fonction des protéines impliquées dans les transports de solutés à travers l'enveloppe du chloroplaste. Si les chloroplastes intacts sont un outil de choix pour caractériser physiologiquement les différents systèmes de transport, ils ne permettent pas de faire le lien entre une protéine et son rôle physiologique. Utilisées sur des chloroplastes intacts, les techniques de patch-clamp présentent les mêmes avantages et les mêmes inconvénients pour étudier les canaux ioniques. A côté de ces approches, les méthodes impliquant la reconstitution des systèmes de transport dans des bicouches artificielles ou dans des liposomes représentent un bon compromis, même si elles ne permettent pas d'identifier avec une précision totale la fonction de transport des protéines purifiées. Une approche physiologique sera donc toujours nécessaire pour apporter la preuve absolue de la fonction de la protéine ainsi caractérisée. Dans ces conditions, l'analyse fonctionnelle de mutants dans lesquels le gène codant cette protéine sera altéré pourra permettre d'établir une connexion plus étroite entre la protéine caractérisée et son rôle dans la plante.

## II. LES TRANSPORTS IONIQUES A TRAVERS L'ENVELOPPE

### A. Introduction

De nombreuses espèces d'ions, comme  $H^+$ ,  $Na^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , coexistent dans le chloroplaste, tous essentiels au développement et au fonctionnement de l'organite. La concentration de certains d'entre eux dans le stroma est indiquée dans le tableau I.

Les ions présents dans le stroma jouent ainsi un rôle essentiel dans le fonctionnement des chloroplastes. Par exemple, le pH du stroma et sa teneur en  $Mg^{2+}$  doivent rester élevés pour permettre un fonctionnement optimal, à la lumière, des enzymes du cycle de Benson et Calvin. A l'obscurité, le pH du stroma et la teneur en  $Mg^{2+}$  reviennent à un niveau plus bas. Le pH du stroma est directement affecté par le contre-échange  $H^+/K^+$  à travers l'enveloppe

(Berkowitz & Wu, 1993). De plus, la teneur en  $Mg^{2+}$  du stroma contrôle l'association à l'enveloppe de protéines impliquées dans la synthèse de la chlorophylle, comme la Mg-chélatase (Nakayama *et al.*, 1998). De même, la teneur en calcium (messager secondaire) fluctue au cours de la journée (Johnson *et al.*, 1995). Ces quelques exemples montrent que plusieurs types de systèmes de transport d'ions doivent exister dans l'enveloppe afin de réguler les flux et les concentrations physiologiques des différents ions.

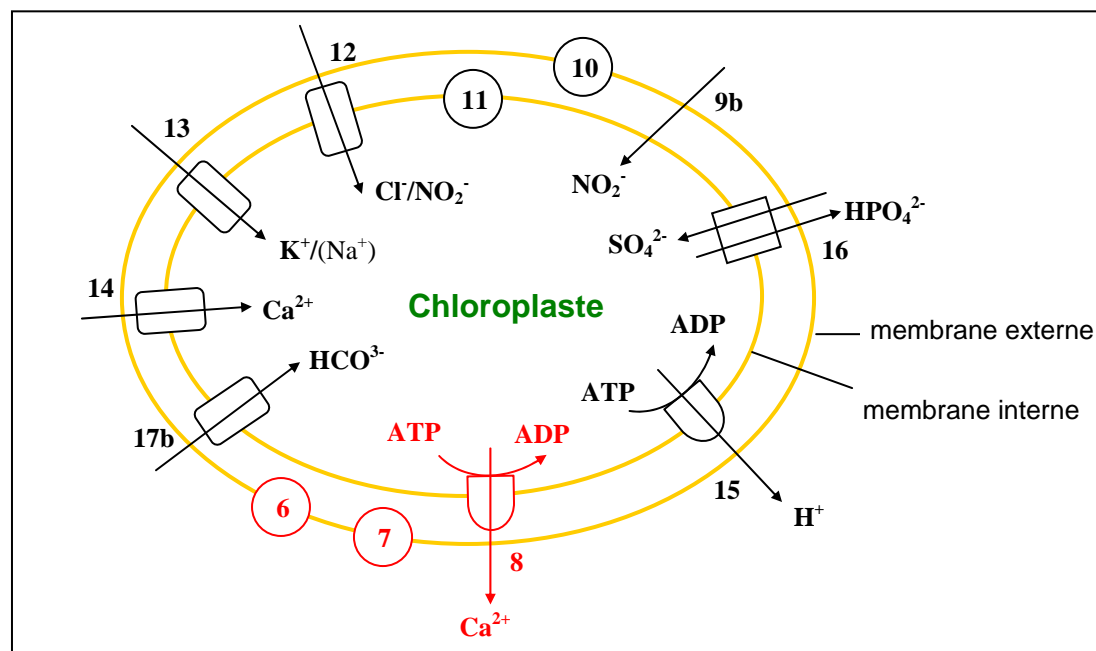
$Mg^{2+}$	$K^+$	$Cl^-$	$Fe^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cu^{2+}$
5 mM (a)	150 mM (b)	50 mM (b)	0,13 mM (e)	0,13 mM (e)	60 $\mu$ M (e)
$Mn^{2+}$	$Ca^{2+}$	Pi			
33 $\mu$ M (e)	total : environ 5 à 10 mM (a, e) libre : quelques $\mu$ M (d)	10 mM à l'obscurité (c) 4 mM à la lumière (c)			

**Tableau I. Concentration de quelques ions dans le stroma des chloroplastes.** (a) Portis & Heldt, 1976 ; (b) Demmig & Grimmier, 1983 ; (c) Mourioux (1981) ; (d) Kreimer *et al.*, 1988 ; (e) Joyard & Douce (1976).

De fait, divers types de protéines permettent le passage des ions à travers les membranes (Fox & Guerinet, 1998). Les canaux ioniques se distinguent des transporteurs ou des pompes ioniques par des vitesses de flux beaucoup plus importantes et par la possibilité de flux passifs à travers les membranes. Le gradient électrochimique à travers la membrane dans laquelle se trouve le canal détermine la direction du transport des ions. Les transporteurs permettent le passage d'ions dans le sens du gradient de concentration et peuvent fonctionner comme uniport ou cotransporteur. Quant aux pompes ioniques, comme les  $H^+$ -ATPases,  $Ca^{2+}$ -ATPases ou  $Na^+/K^+$ -ATPases, leur fonctionnement requiert une quantité d'énergie considérable pour permettre le transport d'ions contre le gradient de concentration.

Les activités permettant le transport d'ions (canaux, pompes..) à travers l'enveloppe du chloroplaste sont présentées dans la figure 3. D'une manière générale, leur fonction exacte est toujours inconnue et de nombreuses incertitudes persistent sur les flux d'ions, dont ceux de protons, pourtant essentiels à la cellule. Il semble que les canaux ioniques de la membrane interne de l'enveloppe puissent être impliqués dans le développement et la régulation des gradients de protons et des potentiels de membrane à travers la membrane interne. Bien que les flux d'ions à travers l'enveloppe du chloroplaste soient importants (maintien du potentiel de membrane, du  $\Delta pH$  et de l'osmolarité), les canaux permettant ces échanges n'ont pas encore été caractérisés au niveau moléculaire. De plus, peu de canaux ioniques ont été identifiés et étant donné la diversité des ions présents dans le chloroplaste, il est très probable que d'autres canaux ioniques existent dans l'enveloppe du chloroplaste. L'accès à la caractérisation biochimique des canaux ioniques de l'enveloppe du chloroplaste est limité par la structure

même de l'enveloppe. En effet, les techniques utilisées pour l'étude des canaux ioniques sont mieux adaptées à la présence d'une seule membrane (comme la membrane limitante des protoplastes ou des vacuoles isolées) qu'à la présence d'une double membrane. Ainsi, la caractérisation des canaux ioniques de l'enveloppe est moins avancée que celle d'autres membranes comme la membrane plasmique ou le tonoplaste.



**Figure 3. Canaux ioniques, activités de transport d'ions et porines répertoriés dans l'enveloppe des chloroplastes.** Les transports caractérisés au niveau moléculaire sont indiqués en rouge

- 6. Canal sélectif pour les acides aminés
- 7. Canal de type porine
- 8.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
- 9b. Transport de  $\text{NO}_2^-$
- 10. Porine de la membrane externe de forte conductance ( $g \cong 1 \text{ nS}$ )
- 11. Porine de la membrane interne de forte conductance ( $g \cong 500 \text{ pS}$ )
- 12. Canal anionique sélectif pour les ions  $\text{Cl}^-$  ( $g \cong 60 \text{ pS}$ )
- 13. Canal cationique sélectif pour les ions  $\text{K}^+$  (et  $\text{Na}^+$ )
- 14. Uniport sélectif pour le calcium
- 15.  $\text{H}^+$ -ATPase
- 16. Antiport sulfate/phosphate
- 17b. Protéine essentielle à l'import du carbone inorganique chez l'algue verte *C. reinhardtii*

## B. Systèmes de transport d'ions caractérisés au niveau physiologique

Des analyses physiologiques effectuées sur des chloroplastes intacts ou sur les membranes de l'enveloppe du chloroplaste ont permis de mettre en évidence plusieurs types de canaux ioniques, des transporteurs ou d'autres protéines (ATPases) qui permettent le mouvement des ions à travers les membranes de l'enveloppe du chloroplaste. La figure 3 montre la complexité de ces systèmes de transport ionique, mais il est fort probable que l'inventaire total des systèmes de transport d'ions à travers l'enveloppe soit encore à faire.

## 1. Les activités canal de type porine (canaux à faible sélectivité)

### a. Caractéristiques des porines

Le transport à travers les membranes externes (des plastes, des mitochondries et des bactéries) est facilité par la présence de protéines appelées porines (Benz, 1994). Les porines localisées dans les membranes externes sont des canaux formant de larges pores de diffusion générale à travers lesquels les petits solutés peuvent diffuser en fonction de leur gradient électrochimique. La conductance de ce type de canal augmente linéairement avec la concentration en solutés. Pour de faibles potentiels membranaires, les porines sont faiblement sélectives pour les anions et sont dans une conformation "ouverte". Le pore prend une conformation "fermée" pour des voltages supérieurs à 20 mV et devient sélectif pour les cations (Benz, 1994). De nombreuses études sur la structure et la fonction des porines présentes dans les bactéries et dans les mitochondries ont été réalisées alors que peu de données existent sur les porines du chloroplaste. La première description d'une activité de type porine dans l'enveloppe a été réalisée par Flügge & Benz (1984). D'autres types de canaux de conductance variée (entre 0,5 nS et 7 nS) ont ensuite été caractérisés. L'activité a été mesurée soit par patch-clamp sur chloroplastes isolés (Pottosin 1992, 1993) soit après reconstitution dans des bicouches artificielles (Flügge & Benz, 1984 ; Heiber *et al.*, 1995 ; Fuks & Homblé, 1995).

### b. Identification d'une porine dans les chloroplastes de l'algue verte *Nitellopsis obtusa* (n° 10 figures 2 et 3)

L'utilisation des techniques de patch-clamp directement sur des chloroplastes isolés de l'algue verte *Nitellopsis obtusa* (Pottosin 1992, 1993) montre la présence de voies de forte conductance sélectives pour les cations et de faible conductance pour les anions. Cette technique a permis l'identification de 3 canaux, dont 2 canaux sélectifs pour les cations et ayant des conductances (dans du KCl 100 mM) de 520 pS et 1 nS, et un canal sélectif pour les anions, d'une conductance de 160 pS. Ces 3 canaux ont des fermetures voltage-dépendantes pour des potentiels à la fois positifs et négatifs. La conductance et les caractéristiques de voltage-dépendance de ces trois canaux sont similaires à celles de la porine de mitochondrie appelée aussi canal anionique voltage-dépendant de la membrane externe de mitochondrie (VDAC). L'analyse plus poussée du canal de conductance 520 pS par Pottosin (1993) montre qu'il a les mêmes caractéristiques que celles déjà décrites pour le canal VDAC de mitochondrie (fermeture pour des potentiels négatifs et positifs, sensibilité au polyanion de König, un polymère de métacrylate/maleate et styrène, 1:2:3, m/m). Toutefois, les canaux VDAC ont une faible sélectivité pour les anions alors que le canal du chloroplaste est faiblement sélectif pour les cations. Enfin, la localisation précise (membrane externe ou membrane interne) de ces canaux n'a pas été précisée.

c. Porine de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste de plantes supérieures (n° 10, figures 2 et 3)

Plusieurs études (Flügge & Benz, 1984 ; Heiber *et al.*, 1995) montrent la présence d'une porine dans la membrane externe de l'enveloppe qui permet la diffusion de molécules hydrophiles de faible masse moléculaire (inférieure à 10 kDa). Ces études sont résumées dans le tableau II. Les très fortes conductances obtenues pour ces canaux suggèrent des structures de type pore (Benz, 1994).

Le canal identifié par Heiber *et al.* (1995) présente les mêmes propriétés (conductance, voltage-dépendance) que le canal décrit par Pottosin (1992) (voir p. 9). Il est possible que ces deux canaux soient aussi identiques à celui identifié par Flügge & Benz (1984) dans la membrane externe de l'enveloppe. Ensemble, ces études montrent la présence d'un canal de type porine dans la membrane externe de l'enveloppe de chloroplaste (n° 10, figures 2 et 3).

♦ *Solubilisation de membranes externes d'enveloppe dans des détergents et fusion dans des bicouches lipidiques planes (Flügge & Benz, 1984) :*

- Canal de forte conductance :  $g \cong 7$  nS (en présence de KCl 1M)

♦ *Reconstitution de vésicules d'enveloppe, utilisation de bicouches lipidiques planes, mesures de patch-clamp (Heiber *et al.*, 1995) :*

- Canal de forte conductance :  $g \cong 1,14$  nS (dans du glutamate de potassium 250/20 mM)

- ouverture pour des potentiels inférieurs à 30 mV

**Tableau II. Identification d'une porine dans la membrane externe de l'enveloppe.** Les mesures de courant sont effectuées soit par patch-clamp sur des protéoliposomes géants soit après insertion dans des bicouches lipidiques planes. Les résultats obtenus montrent la présence d'un canal de forte conductance.

d. Porine de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste de plantes supérieures (n° 11, figures 2 et 3)

Des mesures d'électrophysiologie sur des vésicules de membrane interne suggèrent la présence de canaux de type porine dans cette membrane (Fuks & Homblé, 1995 ; Heiber *et al.*, 1995). Les caractéristiques de ce canal sont décrites dans le tableau III.

Malgré certaines similarités, cette porine apparaît différente de celles qui ont été caractérisées dans la membrane externe de chloroplastes et de la porine VDAC des mitochondries (Fuks & Homblé, 1995). En effet, ces canaux n'ont pas la même conductance, ni le même temps d'ouverture.

La mise en évidence d'une telle activité dans la membrane interne pose d'autre part la question de son rôle physiologique. D'après Fuks & Homblé (1995), dans des conditions physiologiques, le potentiel électrique de la membrane interne étant de -100 mV, ce canal



serait surtout fermé et ne dissiperait donc pas le gradient électrochimique à travers la membrane interne. Le canal décrit par Heiber *et al.* (1995) est vraisemblablement identique à celui décrit par Fuks & Homblé (1995) car ils ont les mêmes caractéristiques. Cependant, Heiber *et al.* (1995) proposent que ce canal n'est probablement pas un pore de diffusion et suggèrent qu'il pourrait faire partie des canaux d'import des protéines.

<p>♦ <i>Mesures d'électrophysiologie sur des vésicules de membranes internes fusionnées à des bicouches lipidiques planes (Fuks &amp; Homblé, 1995) :</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Canal de forte conductance : <math>g \cong 525</math> pS</li><li>- La conductance augmente linéairement avec la concentration de solutés</li><li>- Canal faiblement sélectif pour les anions</li><li>- Canal majoritairement fermé pour des potentiels négatifs</li><li>- Canal de type porine</li></ul>
<p>♦ <i>Mesures d'électrophysiologie sur des vésicules d'enveloppe fusionnées à des bicouches lipidiques planes (Heiber <i>et al.</i>, 1995) :</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Canal de forte conductance <math>g \cong 540</math> pS</li><li>- Canal impliqué dans l'import des protéines ?</li></ul>

**Tableau III. Identification d'une porine associée à la membrane interne de l'enveloppe.**

## 2. Les canaux sélectifs pour les anions (n° 12, figures 2 et 3)

Des flux de  $\text{Cl}^-$  à travers l'enveloppe ont été détectés dans les chloroplastes de l'algue verte *Eremosphera viridis* grâce à l'utilisation de microélectrodes sélectives pour certains ions (Thaler *et al.*, 1992). D'autre part, utilisant des techniques de patch-clamp sur des liposomes géants contenant des protéines de l'enveloppe de chloroplastes d'épinard, Heiber *et al.* (1995) ont analysé les courants sélectifs pour les anions. Dans les conditions expérimentales utilisées (solutions symétriques de Tris/HCl 100 mM), les courants ioniques mesurés sont principalement dus aux ions chlorure. Un canal anionique (chlorure) de faible conductance ( $g \cong 60$  pS) pourrait donc exister dans la membrane interne de l'enveloppe (Heiber *et al.*, 1995).

Les transports d'anions à travers la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste ont aussi été étudiés par mesure de la dispersion de lumière sur chloroplastes intacts (Fuks & Homblé, 1999). Cette technique permet d'estimer de façon quantitative les flux de solutés à travers les organites. Les mesures sont effectuées en présence de divers anions ou de valinomycine (ionophore permettant le passage des ions  $\text{K}^+$ ). Leurs résultats indiquent la présence d'une voie anionique très sélective pour les anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{NO}_2^-$  et très faiblement sélective pour les anions  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ . Les flux de  $\text{Cl}^-$  suggèrent que l'import de  $\text{Cl}^-$  est dépendant d'une protéine membranaire distincte de celle transportant les ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Ces différentes études suggèrent donc fortement l'existence d'un canal  $\text{Cl}^-$  dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste.

### 3. Canaux sélectifs pour les cations

#### a. Canal $\text{K}^+$

$\alpha$ . Identification d'un canal  $\text{K}^+$  (n° 13, figures 2 et 3)

De nombreuses études physiologiques rapportent la présence d'un canal  $\text{K}^+$  dans l'enveloppe des chloroplastes. Les premières identifications de flux de  $\text{K}^+$  ont été réalisées par Wu & Berkowitz (1991, 1992a) sur des chloroplastes intacts d'épinard et sur des protéoliposomes contenant des protéines d'enveloppe solubilisées. L'utilisation d'inhibiteurs de canaux ioniques (lidocaïne, TEA : inhibiteurs de canaux  $\text{K}^+$ ) et des mesures d'import d'un analogue du  $\text{K}^+$  ( $^{86}\text{Rb}^+$ ) dans des chloroplastes isolés indiquent la présence d'un canal potassium dans la membrane interne de l'enveloppe. D'autres études ont été effectuées (Wang *et al.*, 1993 ; Mi *et al.*, 1994 ; Heiber *et al.*, 1995), elles sont résumées dans le tableau IV.

<p>♦ <i>Extraction des protéines de la membrane interne dans des détergents et introduction dans des liposomes, mesure des flux cationiques (Wang et al., 1993) :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'un canal <math>\text{K}^+</math></li> <li>- Tests d'inhibiteurs (TEA, lidocaïne : inhibiteurs de canaux <math>\text{K}^+</math> ; TTX et amiloride : inhibiteur de canaux <math>\text{Na}^+</math>) : les ions <math>\text{Na}^+</math> et <math>\text{K}^+</math> sont interchangeable, présence d'une seule protéine pour faciliter le transport de ces deux ions</li> </ul>
<p>♦ <i>Utilisation de radioisotopes pour mesurer les flux d'ions sur des vésicules natives de membrane interne (Mi et al., 1994) :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Le TEA et le <math>\text{Ba}^{2+}</math> (inhibiteur spécifique des canaux <math>\text{K}^+</math>) diminuent l'import du <math>\text{K}^+</math></li> <li>- L'ion <math>\text{Mg}^{2+}</math> a un effet inhibiteur (dû à une interaction du cation divalent avec les membranes)</li> </ul>
<p>♦ <i>Mesures d'électrophysiologie après fusion d'enveloppe ou de membrane interne d'enveloppe dans des bicouches lipidiques planes :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'un canal <math>\text{K}^+</math>, conductance de <math>g \cong 160</math> pS, voltage indépendant (Mi <i>et al.</i>, 1994)</li> <li>- Présence d'un canal <math>\text{K}^+/\text{Na}^+</math>, conductance de <math>g \cong 100</math> pS, voltage dépendant, ATP et <math>\text{Mg}^{2+}</math> dépendant (Heiber <i>et al.</i>, 1995).</li> </ul>

#### **Tableau IV. Identification d'un canal $\text{K}^+$ .**

Le canal  $\text{K}^+$  identifié serait en fait un canal  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  car il présente une perméabilité équivalente pour ces 2 ions (Heiber *et al.*, 1995). Sachant que le potassium est le cation le plus abondant et le plus important physiologiquement dans le chloroplaste, ce canal sélectif pour les cations est appelé canal  $\text{K}^+$ . Les canaux identifiés par Mi *et al.* (1994) et Heiber *et al.* (1995) ont des caractéristiques différentes. Cependant les protocoles expérimentaux utilisés

dans ces deux études sont différents, et ces 2 canaux  $K^+$  sont probablement identiques. Ce canal serait impliqué dans la régulation du pH du stroma.

β. Purification partielle du canal  $K^+$  (n° 13, figures 2 et 3)

Les canaux  $K^+$  présentent une séquence conservée au niveau de la région formant le pore et donc le filtre sélectif du canal. A partir de cette séquence, Mi *et al.* (1994) ont synthétisé un peptide afin d'obtenir un anticorps dirigé contre cette séquence. Cet anticorps reconnaît plusieurs canaux  $K^+$  (canaux de mammifère drk1 et maxi-K, canal  $K^+$  KAT1 de plante), et réagit avec un polypeptide de 62 kDa localisé dans la membrane interne de l'enveloppe (Mi *et al.*, 1994 ; Mi & Berkowitz, 1995). Les essais d'immunopurification sur des protéines de l'enveloppe se sont révélés infructueux, l'épitope contre lequel est dirigé l'anticorps n'étant probablement pas accessible lorsque la protéine est dans sa conformation native. Des purifications partielles de ce canal ont été effectuées en suivant la présence de la protéine par marquage immunologique et par mesure de l'activité. Si l'activité de canal  $K^+$  évolue en parallèle avec le signal immunologique, la protéine de 62 kDa n'a cependant jamais été visualisée après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes (même après coloration au nitrate d'argent), probablement à cause de la très faible abondance des canaux ioniques dans la membrane. Mi *et al.* (1994) concluent de ces expériences qu'une protéine de l'enveloppe est un canal  $K^+$ , qui peut être détecté avec des anticorps dirigés contre le "filtre sélectif" des canaux  $K^+$ . Cette protéine est très faiblement représentée.

b. Canal  $Ca^{2+}$  (n° 14, figures 2 et 3)

Quelques études ont été effectuées sur l'import du  $Ca^{2+}$  dans le chloroplaste. Le calcium est considéré comme l'un des seconds messagers les plus importants dans les processus de signalisation cellulaire chez les végétaux. La concentration en calcium cytosolique doit être extrêmement régulée car cet ion non métabolisable est toxique à des concentrations élevées (Ranjeva *et al.*, 1996). Cette concentration cytosolique est maintenue à des niveaux inférieurs au micromolaire par des processus d'efflux et d'influx. La concentration en calcium total dans le stroma est de l'ordre d'une dizaine de mM (Portis & Heldt, 1976) alors que la concentration en calcium libre est de l'ordre de quelques  $\mu$ M (Kreimer *et al.*, 1988). Le chloroplaste constitue donc un réservoir de calcium pour le cytosol mais sous forme complexée. D'autre part, Johnson *et al.* (1995) ont montré la présence d'oscillations circadiennes de calcium libre dans le chloroplaste. Ils estiment que les pics de calcium libre varient d'une concentration en calcium libre inférieure à 150 nM jusqu'à une concentration de 5 à 10  $\mu$ M. Ces oscillations dans la concentration de calcium libre permettraient de contrôler les enzymes dépendantes du calcium et les activités ayant une base circadienne.

α. Mise en évidence de flux de calcium

Des études effectuées par Muto *et al.* (1982) sur des chloroplastes intacts indiquent que l'influx de calcium aurait lieu par un mécanisme d'antiport  $H^+/Ca^{2+}$ , dont le  $K_m$  serait

seulement légèrement supérieur à celui de la concentration cytoplasmique en calcium. Cependant, Kreimer *et al.* (1985a) montrent que les chloroplastes isolés importent du calcium à la lumière et que ce transport se fait via un uniport électrogénique. Cet influx de calcium est lié au transport électronique photosynthétique. Ces deux mécanismes d'influx du calcium sont différents, mais dans les deux cas, l'influx de calcium est stimulé par la lumière.

Dans une autre étude, Kreimer *et al.* (1985b) proposent que l'influx de calcium ne dépendrait pas de la présence d'une ATPase car l'entrée de calcium est insensible au vanadate, et est inhibée par des inhibiteurs de transporteurs de type uniport.

#### *β. Identification d'un uniport $Ca^{2+}$ (n° 14, figures 2 et 3)*

Au lieu d'utiliser les chloroplastes intacts de pois, Roh *et al.* (1998) ont choisi une approche alternative pour étudier ces flux à partir de vésicules constituées de membranes internes purifiées d'enveloppe. Ce système a l'avantage de pouvoir charger les vésicules avec des sondes fluorescentes. D'autre part, le pH et le contenu ionique des milieux intravésiculaire et externe peuvent être manipulés facilement. La sonde fura 2, sensible à la concentration en calcium, a été utilisée pour suivre le transport de cet ion à travers des vésicules de membranes internes d'enveloppe. Les résultats obtenus indiquent la présence d'un uniport dans les vésicules. L'influx de calcium est stimulé par des différences de potentiel négatives. Ces résultats confirment donc ceux obtenus par Kreimer *et al.* (1985b) sur des chloroplastes intacts. La vitesse initiale de l'activité d'uniport  $Ca^{2+}$  à travers la membrane interne de l'enveloppe dans des conditions physiologiques de calcium libre est de 0,5/1,6  $\mu\text{mol/h/mg}$  de chlorophylle, et est stimulée par un potentiel de membrane négatif. L'utilisation d'un inhibiteur d'échangeur  $Ca^{2+}/H^+$  ( $LaCl_3$ ) indique que le calcium ne passe pas par l'intermédiaire d'un antiport  $Ca^{2+}/H^+$ . Les mesures montrent aussi une préférence pour le transport du calcium en faveur d'un import.

Ainsi, deux types de transport du calcium semblent co-exister dans l'enveloppe : un système permettant l'efflux de calcium via une protéine ressemblant à une  $Ca^{2+}$ -ATPase (voir p 18), et un transport de type uniport permettant l'import de  $Ca^{2+}$  (n° 8 et 14, figures 2 et 3).

#### **4. L'ATPase pompe à protons et les flux $H^+/K^+$ (n° 15, figures 2 et 3)**

La photosynthèse dépend du maintien d'un pH élevé dans le stroma car plusieurs enzymes du cycle de réduction du carbone ont une activité optimale à pH alcalin. Ce phénomène nécessite la présence d'un gradient de pH entre le stroma illuminé (pH  $\approx$  8) et à la fois le lumen des thylacoïdes (pH  $<$  6) et le cytosol (pH 7). Bien que les flux de protons soient essentiels au fonctionnement des plastes (gradient de pH, potentiel de membrane ...), ils sont peu connus.

##### a. ATPase pompe à protons (n° 15, figures 2 et 3)

Le tableau V donne un aperçu des observations faites dans plusieurs études sur la présence potentielle d'une  $H^+$ -ATPase dans l'enveloppe du chloroplaste. Il existe effectivement une

activité ATPase  $Mg^{2+}$ -dépendante dans l'enveloppe (Douce *et al.*, 1973 ; Joyard & Douce, 1975) mais sa fonction exacte n'est pas connue. Bien que des études suggèrent la présence d'une ATPase pompe à protons, le lien entre l'activité ATPase de l'enveloppe et les flux de protons n'a pas été prouvé.

Ainsi, le rôle physiologique d'une éventuelle ATPase pompe à protons présente dans l'enveloppe des chloroplastes reste toujours très controversé. Elle pourrait être impliquée dans un efflux direct de  $H^+$  à l'extérieur du chloroplaste de manière à maintenir, à la lumière, un  $\Delta pH$  entre cytosol et stroma. Les mesures effectuées par Shingles & Mc Carty (1994) confirment cette hypothèse. Cependant, la présence de cette protéine dans l'enveloppe du chloroplaste n'a jamais été formellement démontrée.

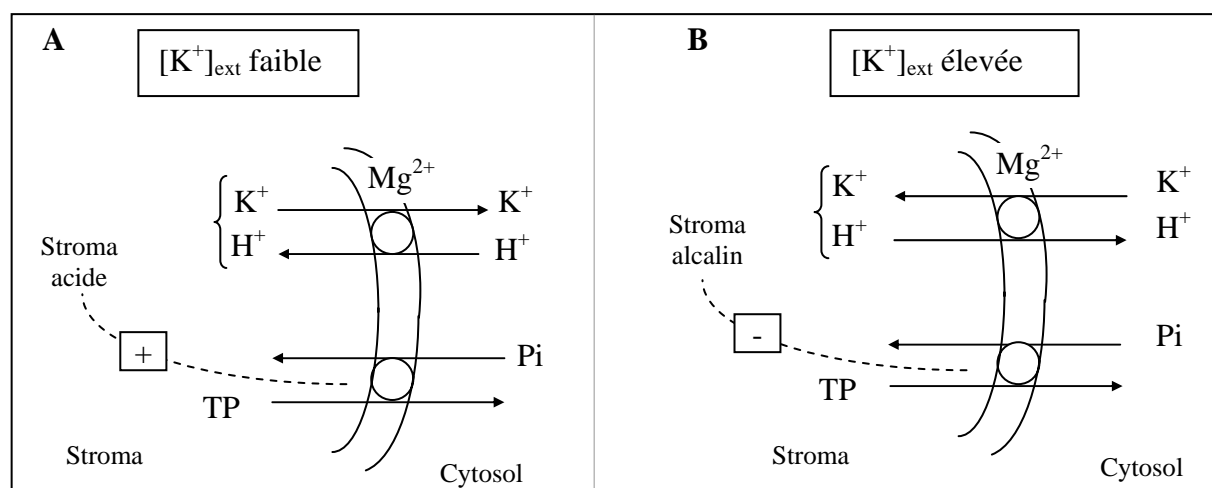
<p>◆ Présence d'une ATPase <math>Mg^{2+}</math>-dépendante associée à l'enveloppe (Douce <i>et al.</i>, 1973)                  Activité insensible au DCCD et au Dio-9, inhibiteurs de l'activité latente de l'ATPase des thylacoïdes                  Non stimulée par les ions <math>K^+</math></p>
<p>◆ L'ATPase de l'enveloppe pourrait être liée aux flux de <math>H^+</math>, elle pourrait agir comme un système de transport efflux <math>H^+</math>/influx <math>K^+</math>.                  Son rôle serait de maintenir un gradient de pH stable (Maury <i>et al.</i>, 1981)</p>
<p>◆ L'ajout de <math>Mg^{2+}</math> sur des chloroplastes illuminés entraîne une acidification du stroma, phénomène inversé par l'addition de <math>K^+</math>. Modèle proposé (Maury <i>et al.</i>, 1981) :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Présence d'un efflux de <math>H^+</math> actif sensible à l'oligomycine</li> <li>2. Présence d'un échange réversible <math>H^+/K^+</math> insensible à l'oligomycine</li> </ol>
<p>◆ Présence dans l'enveloppe d'une ATPase insensible à l'oligomycine (Mc Carty <i>et al.</i>, 1984)</p>
<p>◆ Présence d'une ATPase dans la membrane interne de l'enveloppe stimulée par <math>K^+</math> et inhibée par l'oligomycine (Wu &amp; Berkowitz, 1992a)</p>
<p>◆ Stimulation de l'ATPase par du <math>Mg^{2+}</math> et du <math>K^+</math>. La stimulation par le <math>K^+</math> est due à une activation de l'enzyme par l'ion <math>K^+</math> ou à un échange <math>K^+/H^+</math> (Shingles &amp; Mc Carty, 1994)</p>

**Tableau V. Quelques observations sur l'ATPase pompe à protons de l'enveloppe du chloroplaste.**

#### b. Les flux $H^+/K^+$

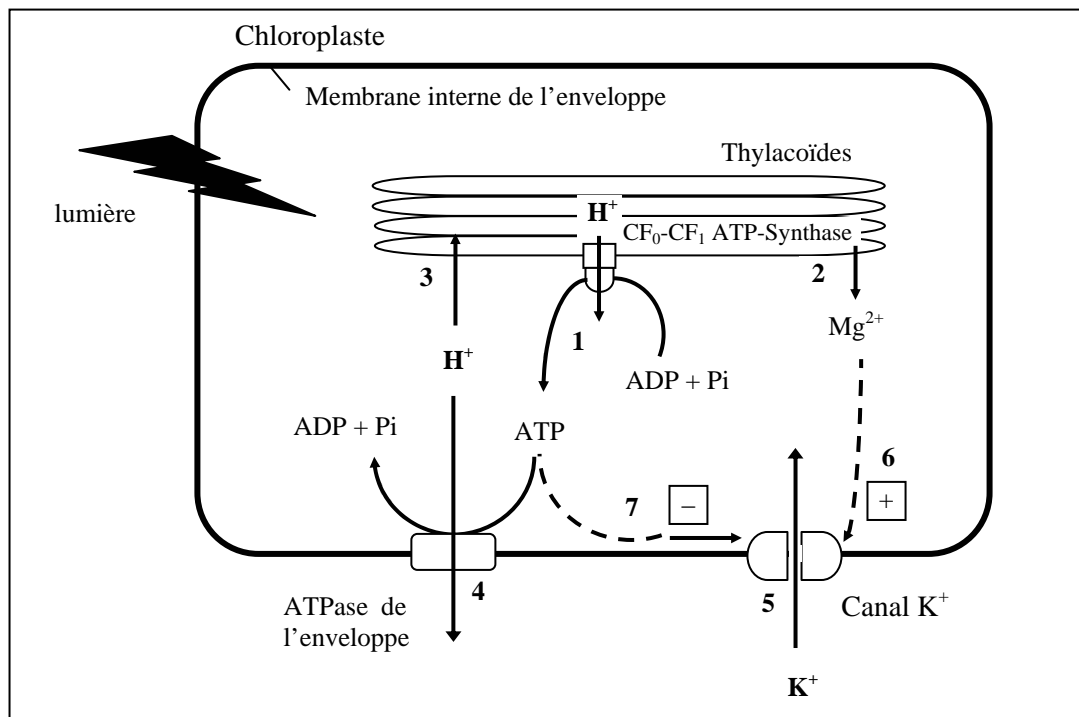
Un "couplage" des flux de  $H^+$  et  $K^+$  a été rapporté dans de nombreuses études. Huber & Maury (1980), sur des chloroplastes intacts, ont proposé un modèle (présenté dans la figure 4) selon lequel le  $Mg^{2+}$  activerait un système d'échange réversible de  $K^+(Na^+)/H^+$  à travers l'enveloppe. Le  $Mg^{2+}$  exogène altérerait le pH du stroma en affectant les mouvements de  $H^+$  à travers l'enveloppe. Les variations de pH semblaient dépendre de la concentration en  $K^+$  du milieu.

Wu & Berkowitz (1992b) ont étudié les flux  $H^+/K^+$  sur des chloroplastes intacts en utilisant la valinomycine ou des inhibiteurs de canaux  $K^+$  (comme le TEA, tétraéthylamonium). Leurs résultats montrent que les flux de  $H^+$  sont indirectement reliés aux flux de  $K^+$  à travers l'enveloppe. Les flux de  $K^+$  sont bidirectionnels et sont facilités par la présence d'un canal  $K^+$  de type uniport. L'efflux de  $K^+$  fournit la force motrice électrique pour le contre-flux de  $H^+$ , et cet efflux de  $K^+$  a un effet indirect sur la photosynthèse à cause de l'acidification du stroma. Ils indiquent aussi que les ions  $Na^+$  peuvent remplacer les ions  $K^+$ .



**Figure 4. Modèle représentant les échanges  $H^+/K^+$  d'après Huber & Maury (1980).** Diagramme schématique de l'échange  $K^+/H^+$  induit par le  $Mg^{2+}$  sur le pH du stroma pour de faible (A) et forte (B) concentrations de  $K^+$  externe, et de l'effet possible du pH sur le transporteur de phosphate. Les auteurs suggèrent que l'échange  $K^+/H^+$  n'a lieu qu'en présence de  $Mg^{2+}$  exogène. +, activation. -, inhibition.

Heiber *et al.* (1995) ont poursuivi l'étude de la corrélation entre le transport des ions  $H^+$  dépendant de la lumière et celui des ions  $K^+$  sur des chloroplastes intacts. Leurs expériences montrent que les flux de protons peuvent être électriquement balancés par le transport d'ions  $K^+$  à travers l'enveloppe du chloroplaste comme cela a déjà été suggéré par Peters & Berkowitz (1991). Ils proposent un modèle (figure 5) selon lequel les flux de protons à travers l'enveloppe du chloroplaste sont probablement conduits par une ATPase pompe à protons et sont indirectement couplés à l'import de potassium à partir du cytosol. Le gradient de pH à travers l'enveloppe du chloroplaste serait régulé par une extrusion active de protons contrebalancée par un contre-flux passif à travers des canaux  $H^+$  ou  $K^+$  (figure 5) (Peters & Berkowitz, 1991 ; Heiber *et al.*, 1995).



**Figure 5. Modèle proposé par Heiber et al. (1995) pour les flux de  $K^+$  et  $H^+$  à travers l'enveloppe du chloroplaste.** L'illumination des chloroplastes engendre une augmentation de l'ATP du stroma (1) produit par photophosphorylation. D'autre part, la concentration en ions  $Mg^{2+}$  augmente dans le stroma (2) suite au relargage (dépendant de la lumière) de ces ions par le lumen des thylacoïdes. Le gradient de protons induit par la lumière à travers l'enveloppe du chloroplaste, qui est dû à l'import des  $H^+$  dans les thylacoïdes (3), est *a priori* maintenu par l'action d'une ATPase pompe à protons de l'enveloppe (4). L'efflux de  $H^+$  est contrebalancé par l'influx de  $K^+$  via un canal  $K^+$  localisé dans l'enveloppe (5). En présence de quantités importantes d'ions  $Mg^{2+}$ , le canal  $K^+$  est activé (6) ce qui entraîne une augmentation de l'influx de  $K^+$  couplé à l'efflux de  $H^+$ . En revanche, la probabilité d'ouverture du canal  $K^+$  est diminuée par des concentrations de l'ordre du millimolaire d'ATP, ce qui diminue l'efflux de  $H^+$  des chloroplastes (7). Par conséquent, le pH du stroma est plus bas, ce qui entraîne une diminution de la vitesse de fixation du  $CO_2$  dépendante de la lumière. La régulation opposée du canal  $K^+$  par les ions  $Mg^{2+}$  et par l'ATP (l'ATP agit sous forme complexée avec le  $Mg^{2+}$ ) doit probablement jouer un rôle crucial dans la régulation de la photosynthèse.

### C. Systèmes de transport d'ions caractérisés au niveau moléculaire

L'identification de la plupart des canaux ioniques dans l'enveloppe est principalement basée sur des études physiologiques. En revanche, la majorité de ces canaux n'a pas encore été identifiée au niveau moléculaire.

La caractérisation fonctionnelle de ces différents types de transporteurs ne peut être faite que lorsque les protéines sont extraites de leurs membranes natives de manière à maintenir leurs conformations actives et leur intégrité fonctionnelle, puis reconstituées dans des systèmes membranaires afin d'effectuer des mesures de transport pour analyser leur fonction. La preuve finale de l'identité d'un transporteur n'est donnée que par des mesures sur des membranes natives. En effet, les reconstitutions dans des vésicules peuvent modifier la spécificité du transporteur. Sur l'ensemble des transporteurs potentiels d'ions de l'enveloppe, seuls trois

d'entre eux ont été caractérisés au niveau moléculaire. Des indications sur leur caractérisation sont décrites ci-dessous.

### **1. Ca<sup>2+</sup>-ATPase de la membrane interne de l'enveloppe (n° 8, figures 2 et 3)**

Une protéine ayant des homologies avec des Ca<sup>2+</sup>-ATPase (appelée PEA1 pour "plastid envelope ATPase") a été localisée dans l'enveloppe des plastes d'*Arabidopsis* (Huang *et al.*, 1993). Cette protéine présente 40 à 44 % d'identité avec les diverses Ca<sup>2+</sup>-ATPases de la membrane plasmique des cellules animales, mais ne possède pas le domaine C-terminal de fixation à la calmoduline. La fonction des Ca<sup>2+</sup>-ATPases consiste à établir un gradient de Ca<sup>2+</sup> à travers les membranes et à maintenir les concentrations de calcium cytoplasmique inférieures au micromolaire.

L'ADNc codant cette protéine a été obtenu par criblage d'une banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* avec un anticorps dirigé contre les protéines de l'enveloppe de 55 à 75 kDa. Cette protéine contient 10 régions hydrophobes qui constituent potentiellement des hélices transmembranaires. Des anticorps dirigés contre cette protéine permettent de détecter un polypeptide de 90-95 kDa dans une fraction de membrane interne de l'enveloppe. Cette protéine de type Ca<sup>2+</sup>-ATPase permettrait de maintenir de faibles concentrations de calcium libre dans le stroma en exportant le calcium du stroma vers le cytosol (Huang *et al.*, 1993). Cependant, cette hypothèse n'a pas été prouvée par des mesures physiologiques.

### **2. Canal de la membrane externe sélectif pour les acides aminés (OEP16) (n° 6, figures 2 et 3)**

#### a. Approche utilisée pour la caractérisation

Récemment, Pohlmeier *et al.* (1997) ont caractérisé une protéine associée à la membrane externe. Leur but initial était d'identifier la porine de la membrane externe de l'enveloppe de chloroplastes de pois. Leur stratégie était basée sur les hypothèses suivantes :

- Le canal majeur de la membrane externe devrait être une protéine abondante comme la protéine centrale OEP75 du canal d'import des protéines.
- Cette protéine devrait être totalement membranaire donc probablement résistante à des traitements par des protéases.

Polhmeier *et al.* (1997) ont ainsi identifié une protéine (OEP16) correspondant à ces différents critères. En effet, OEP16 est une protéine abondante de la membrane externe, elle est résistante aux traitements par des protéases. De plus, cette protéine se comporte comme une protéine intégrale puisqu'elle n'est pas extraite lors de traitements des membranes par de fortes concentrations salines (NaCl 1M) ou par des lavages effectués à pH alcalin (pH 11). La protéine séparée par électrophorèse en conditions dénaturantes a été utilisée pour l'obtention de séquences internes et N-terminales. Ceci a permis d'identifier un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* qui présente des homologies significatives avec ces séquences.



## b. Caractéristiques du canal OEP16

OEP16 est une protéine très conservée et présente dans une grande variété de plantes. Elle est présente dans les plastes non chlorophylliens (racines, tiges) et chlorophylliens (feuilles) et son expression n'est pas dépendante de la lumière.

Des algorithmes de prédiction de structure secondaire indiquent que cette protéine traverse la membrane externe par 4 feuillets  $\beta$  et 3 hélices  $\alpha$ . Cette structure putative est différente de celle des porines classiques qui sont composées de feuillets  $\beta$  amphiphiles. Des expériences de pontage chimique ont montré que OEP16 forme un homodimère *in situ* (Pohlmeier *et al.*, 1997).

### • Fonction du canal OEP16

La protéine OEP16 a été insérée dans des liposomes, qui ont ensuite été utilisés pour analyser sa fonction. Des mesures de courant ont été effectuées après insertion des protéoliposomes dans des bicouches lipidiques planes, ainsi que des mesures de variations de turbidité de la suspension de protéoliposomes. Le tableau VI résume les mesures effectuées et les résultats obtenus. Ils montrent que OEP16 forme un canal faiblement sélectif pour les cations, et de forte conductance ( $g \cong 1,2$  nS). Ce canal est sélectif pour les acides aminés et les molécules contenant un squelette d'acides aminés (Pohlmeier *et al.*, 1997).

<p><i>Mesure d'électrophysiologie dans des bicouches lipidiques planes :</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>◆ Canal de conductance <math>g \cong 1,2</math> nS (dans KCl 1M)</li><li>◆ Large pore, interaction faible avec les ions</li><li>◆ Probabilité d'ouverture maximale pour <math>V_m = 0</math> mV</li></ul>
<p><i>Mesure de la variation de turbidité d'une solution de liposomes :</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>◆ Perméabilité aux acides aminés</li><li>◆ Imperméabilité aux sucres non chargés, aux trioses phosphate</li></ul>

**Tableau VI. Fonction et caractéristiques du canal OEP16 (Pohlmeier *et al.*, 1997).**

## **3. Caractérisation d'un canal de type porine (OEP24) dans la membrane externe de l'enveloppe (n° 7, figures 2 et 3)**

En utilisant la même approche que celle utilisée pour l'identification de OEP16, Pohlmeier *et al.* (1998) ont identifié une nouvelle protéine de la membrane externe ayant une activité canal : OEP24.

### a. Caractéristiques du canal OEP24

OEP24 ne possède pas de peptide de transit, et ne présente pas d'homologies significatives avec d'autres protéines. Elle présente le même profil d'expression que le canal OEP16.

Les algorithmes de prédiction de structure et l'analyse d'hydropathie ne suggèrent pas la présence d'une conformation en hélices. En revanche, 7 feuilletts  $\beta$  amphiphiles sont prédits. Cette structure est typique des structures secondaires des porines de bactéries et de mitochondries. De plus, cette protéine contient une grande proportion d'acides aminés hydrophiles, ce qui correspond aussi à une caractéristique des protéines formant des pores (Cowan *et al.*, 1992 ; De Pinto *et al.*, 1991 ; Benz, 1994). Cette prédiction de structure secondaire a été confirmée par des mesures de dichroïsme circulaire. Cette protéine n'est pas solubilisée par traitement des membranes par du NaCl 1M, ni par des lavages à pH alcalin. Elle correspond donc à une protéine membranaire intégrale comme OEP16. OEP24 peut former des homodimères *in situ* (Pohlmeier *et al.*, 1998).

#### b. Fonction de la protéine OEP24

Afin d'étudier la fonction de OEP24, des liposomes contenant cette protéine ont été incorporés dans des bicouches lipidiques planes et des mesures électrophysiologiques ont été réalisées. Les résultats obtenus suggèrent que OEP24 serait un canal faiblement sélectif pour les cations. En fait, l'interaction de ce canal avec certains ions comme les ions  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  est très faible, indiquant qu'il formerait plutôt un pore large. La probabilité d'ouverture de ce canal est maximale à 0 mV comme pour les porines classiques (Pohlmeier *et al.*, 1998).

Les liposomes contenant cette protéine ont aussi été utilisés pour tester la perméabilité à d'autres molécules non chargées en analysant les variations de turbidité de la suspension de liposomes. Ce canal est imperméable au dextran (molécule de masse apparente de 10 kDa), faiblement perméable au saccharose, et fortement perméable au KCl (Pohlmeier *et al.*, 1998).

Pour conclure, OEP24 formerait un canal de forte conductance ( $g \cong 1,3$  nS dans KCl 1M), voltage dépendant et faiblement sélectif pour les cations. Ce canal permettrait le passage de nombreux substrats comme les sucres, les sucres phosphorylés, les acides dicarboxyliques, le Pi et l'ATP à travers la membrane. Ce canal semble différent de la porine identifiée dans la membrane externe de l'enveloppe (Flügge & Benz, 1984) car il est plus sélectif.

#### **4. Conséquence de la présence des canaux OEP16 et OEP24 sur la perméabilité de la membrane externe de l'enveloppe**

Il est généralement accepté que les membranes externes de mitochondries et de plastes ne forment pas de barrières sélectives car elles contiennent des pores non sélectifs. En effet, Heldt & Rapley (1970) ont effectué des mesures de perméabilité de molécules comme le saccharose et les nucléotides sur le chloroplaste. Leurs résultats suggèrent que la membrane externe de l'enveloppe est perméable à ces molécules alors que la membrane interne contient des transporteurs spécifiques.

La membrane externe du chloroplaste de pois ne semble pas suivre les mêmes règles puisqu'elle contient au moins deux canaux sélectifs : OEP16 et OEP24 (Pohlmeier *et al.*,

1997, 1998). L'existence de canaux sélectifs dans la membrane externe de l'enveloppe pourrait être nécessaire lorsque les substrats métaboliques sont en quantité limitante. En effet, dans ce cas, la concentration du substrat est très faible et nécessite pour son transport un canal de forte affinité. Ceci pourrait expliquer la présence dans la membrane externe de l'enveloppe d'un canal de type porine OEP24 et d'un canal sélectif pour les acides aminés OEP16. Ces deux protéines, OEP24 et OEP16 ne présentent pas de similarités avec les porines de bactéries ou de mitochondries (Pohlmeyer *et al.*, 1997, 1998).

#### **D. Activité canal ionique des transporteurs de phosphate/triose phosphate (IE30) et de 2-oxoglutarate/malate (IE45) (n° 1 et 2, figure 2)**

Les transporteurs de phosphate/triose phosphate (TPT) et de 2-oxoglutarate/malate sont des systèmes de transport de la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes. Pour des concentrations physiologiques en substrats, le TPT permet un antiport strict entre un phosphate inorganique et un composé en C3 portant un phosphate sur l'atome de carbone 3, comme l'acide 3-phosphoglycérique (APG) ou triose phosphate. Le transporteur de 2-oxoglutarate/malate est aussi un antiport. Dans certaines conditions expérimentales, ces transporteurs peuvent cependant fonctionner aussi comme des canaux ioniques.

En effet, des mesures de patch-clamp sur des liposomes géants contenant le TPT révèlent une activité de canal ionique associée à ce transporteur. Cette protéine peut fonctionner comme un canal voltage-dépendant sélectif pour les anions. Les ions Cl<sup>-</sup> et le Pi sont transportés dans un système de type uniport (Schwarz *et al.*, 1994). Le transport de Cl<sup>-</sup> est stimulé environ 5 fois par le Pi et est complètement inhibé par le DIDS, un inhibiteur des canaux anioniques. Ainsi, des concentrations saturantes en Pi de part et d'autre de la membrane entraîneraient un changement dans le mode de transport du TPT qui passe alors d'un antiport strict à un uniport. La conductance du canal lorsqu'il est totalement ouvert est de l'ordre de 140 pS (dans du KCl 100 mM) (Schwarz *et al.*, 1994).

Le transporteur de 2-oxoglutarate/malate présente aussi une activité canal ionique dont la conductance est plus faible, de l'ordre de 14 pS (dans 100 mM KCl). Cette activité est inhibée par un inhibiteur de canal chlorure (Menzlaff & Flügge, 1993 ; Schwarz *et al.*, 1994).

Une des raisons avancées pour expliquer ce type d'observations est que les différentes classes de transporteurs (dont les canaux ioniques) partageraient des motifs structuraux communs et proviendraient probablement d'un ancêtre commun (Flügge, 1999). Des motifs structuraux très proches ont été proposés pour les protéines formant des transporteurs et des canaux ioniques. Ainsi, un changement structural au niveau du pore permettrait le transport soit par un canal ionique soit par un antiport (Schwarz *et al.*, 1994). Il convient cependant de noter que les activités de canal ionique pour ces transporteurs ne sont observées que lorsque les concentrations en substrats physiologiques (triose phosphate pour le TPT, malate et

oxoglutarate pour le transporteur de 2-oxoglutarate/malate) sont faibles par rapport à celles des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{Cl}^-$ . Ces observations posent donc le problème de la réalité physiologique d'une telle activité canal ionique qui pourrait être due aux conditions expérimentales sur des systèmes membranaires artificiels.

## E. Autres types de transport pouvant impliquer des mouvements d'ions

### 1. Transport du sulfate et des nitrites (n° 9a, 9b, 16, figures 2 et 3)

Au sein de la cellule végétale, les plastes sont les seuls sites de réduction des nitrites et des sulfates (Anderson, 1990, Crawford, 1995).

#### a. Transport des nitrites (n° 9a et 9b, figure 2)

Les plantes utilisent le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) comme principale source d'azote. Le nitrate est converti en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) dans le cytoplasme, puis importé dans le chloroplaste où il est transformé en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) par une réaction dépendante de la lumière. Le  $\text{NH}_4^+$  est immédiatement incorporé dans l'acide glutaminique pour former la glutamine. L'azote est ensuite fourni au reste de la cellule via l'exportation des acides aminés. Le chloroplaste est le seul site de réduction du nitrite. Heber & Purczeld (1978) ont montré que le  $\text{NO}_2^-$  et le  $\text{HNO}_2$  sont capables de traverser l'enveloppe du chloroplaste. Ils suggèrent que la forme  $\text{HNO}_2$  serait la forme préférentiellement transportée. L'import de  $\text{NO}_2^-$ , par un système d'échange avec un anion du chloroplaste, n'apparaîtrait que lorsque la quantité de  $\text{HNO}_2$  dans le milieu serait trop faible. Ainsi, deux hypothèses existent pour le transport du  $\text{NO}_2^-$  à travers la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. Le transport se fait soit sous la forme  $\text{HNO}_2$  (Kaiser & Herber, 1983), soit sous la forme de l'ion  $\text{NO}_2^-$  (Brunswick & Cresswell, 1988a, 1988b) et ce transport est lié aux flux de protons.

#### • Identification du mode de transport du nitrite

Brunswick & Cresswell (1988a, 1988b) ont montré que l'import du nitrite est lié au pH du stroma et à la réduction du nitrite. Des analyses d'import du  $\text{NO}_2^-$  en présence de découplants (sels d'ammonium, *N*-éthylmaléimide ou NEM), d'inhibiteurs de canaux anioniques (DIDS, APMB), suggèrent qu'un canal spécifique permettrait l'import du  $\text{NO}_2^-$ . Ce transport aurait lieu en parallèle avec la diffusion passive du  $\text{HNO}_2$  à travers l'enveloppe (Brunswick & Cresswell, 1988a, 1988b).

Plus récemment, Shingles *et al.* (1996) ont utilisé des vésicules de membrane interne de l'enveloppe chargée en pyranine pour étudier le transport du  $\text{NO}_2^-$ . La pyranine est un fluorochrome dont la fluorescence dépend du pH. Il est donc possible de mesurer des variations de pH interne par fluorimétrie. Les résultats obtenus montrent que le transport du nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) n'est pas une étape limitante pour la conversion du nitrite en  $\text{NH}_4^+$ . Ils suggèrent aussi que le transport des ions  $\text{NO}_2^-$  lié aux protons se fait par diffusion de  $\text{HNO}_2$  à travers la

membrane suivie d'une dissociation en  $H^+$  et  $NO_2^-$  dans la vésicule. En effet, ce transport est dépendant du pH externe, la vitesse de transport initiale suit l'augmentation de la concentration en  $HNO_2$ , alors que le pH extérieur diminue. De plus, les vitesses initiales de transport sont identiques à celles obtenues dans des vésicules d'asolectine dépourvues de protéines. Une acidification des vésicules est observée lors du transport de nitrite. Ainsi, l'activité de transport mesurée résulte d'une diffusion rapide de  $HNO_2$  à travers la membrane. Ce mouvement de  $HNO_2$  est dépendant du maintien d'un gradient de pH à travers l'enveloppe du chloroplaste.

Par conséquent, la diffusion passive du  $HNO_2$  est très probablement le mode principal d'influx de  $NO_2^-$  dans les chloroplastes, bien que l'existence d'un transporteur spécifique ne soit pas à exclure.

#### b. Transport du sulfate (n° 16, figures 2 et 3)

Le chloroplaste est le seul site de réduction du sulfate en sulfite, puis en sulfure. Par conséquent, un système d'import du sulfate doit exister dans l'enveloppe du chloroplaste. Le sulfate est ensuite incorporé dans certains acides aminés, dans des cofacteurs comme le CoenzymeA, le glutathion, dans des lipides (sulfolipide)... Mourioux & Douce (1978) ont mis en évidence la présence d'un transporteur spécifique du sulfate dans l'enveloppe du chloroplaste. Ce transporteur catalyse par échange-diffusion strict l'import du sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) contre l'export en quantité équivalente de phosphate ( $HPO_4^{2-}$ ). Ce transporteur est différent du transporteur de phosphate/triose phosphate.

#### **2. Import du $CO_2$ (n° 17a et 17b, figure 2)**

Le chloroplaste a besoin de  $CO_2$  pour effectuer la photosynthèse. Il a été admis pendant longtemps que la diffusion passive du  $CO_2$  à travers l'enveloppe suffisait pour alimenter la photosynthèse. Récemment, Rolland *et al.* (1997) ont démontré qu'une protéine (codée par le gène chloroplastique *ycf10*) de la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes de *Chlamydomonas reinhardtii* est indispensable à l'approvisionnement du chloroplaste en carbone inorganique ( $CO_2$  et  $HCO_3^-$ ) lors de la photosynthèse. En effet, des mutants de *C. reinhardtii* dont le gène *ycf10* est interrompu, sont affectés dans l'import du  $CO_2$  et du  $HCO_3^-$ . Ces résultats suggèrent qu'il existe au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, un système dépendant du produit du gène *ycf10*, qui régule l'import du carbone inorganique. Ces expériences ont été réalisées chez les algues vertes. Cependant, un gène homologue a aussi été identifié chez les plantes supérieures.

#### **3. Transporteurs de métaux**

Les chloroplastes renferment de nombreux métaux, comme le magnésium ( $Mg^{2+}$ ), le manganèse ( $Mn^{2+}$ ), le zinc ( $Zn^{2+}$ ), le cuivre ( $Cu^{2+}$ ), le fer ( $Fe^{2+}$ )...(voir tableau I). Ces éléments jouent un rôle crucial dans les chloroplastes des organismes photosynthétiques, en

particulier au niveau de la chaîne de transfert des électrons des thylacoïdes (par exemple dans le complexe cytochrome  $b_6/f$ , la plastocyanine, les photosystèmes, etc...). Actuellement, les seuls transporteurs de métaux connus ont été caractérisés dans la membrane plasmique. Par exemple, un transporteur (IRT1) d'ions métalliques a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* (Korshunova *et al.*, 1999). La protéine IRT1 peut transporter du Fe, du Mn, du Zn et probablement du Co et du Cd. Le même type de transporteur devrait exister dans l'enveloppe du chloroplaste.

### III. AUTRES TYPES DE TRANSPORT A TRAVERS L'ENVELOPPE

#### A. Transport de métabolites

La figure 6 résume les principaux transporteurs de métabolites caractérisés dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. Les transporteurs sont en général des protéines membranaires contenant 12 hélices transmembranaires. Les principales exceptions sont les transporteurs de phosphate/triose phosphate et de phosphate/phosphoénolpyruvate qui possèdent 6 hélices transmembranaires et forment des homodimères (Flügge, 1985 ; Fischer *et al.*, 1997).

#### 1. Transport de métabolites couplés au transport de Pi

Les plastes contiennent plusieurs types de transporteurs de phosphate avec des structures différentes mais des spécificités qui se recouvrent (transporteur de phosphate/triose phosphate, phosphate/phosphoénolpyruvate, glucose/phosphate). Cette complexité permet ainsi d'assurer l'import d'un substrat phosphorylé dans les divers types de plastes (chlorophylliens ou non, plastes de plantes à métabolisme de type C3 ou C4) même en présence de fortes concentrations d'autres métabolites phosphorylés.

##### a. Le transporteur de phosphate/triose phosphate (n° 1, figures 2 et 6)

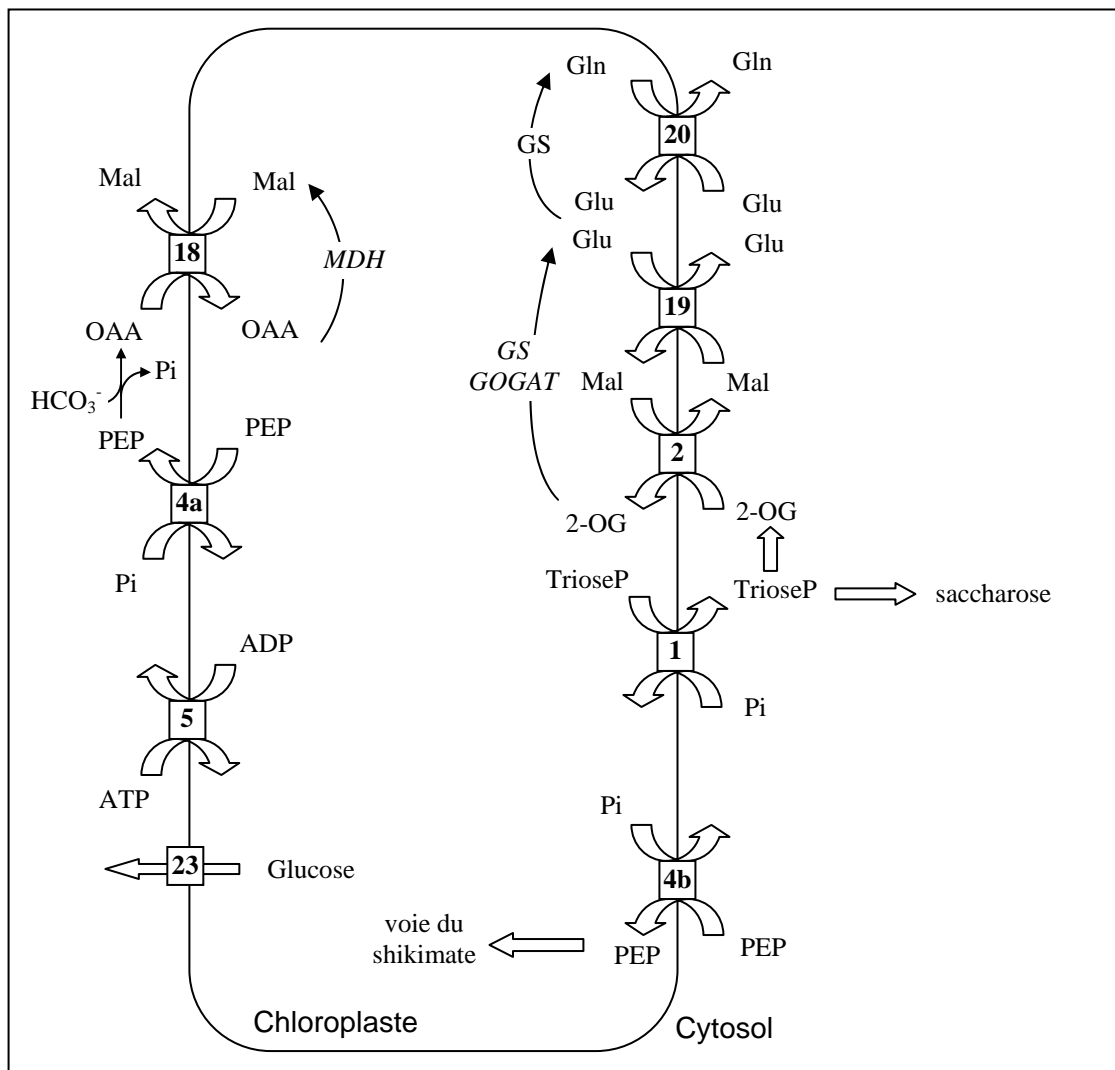
Le transporteur de phosphate/triose phosphate (TPT) est impliqué dans le transport du carbone fixé au cours de la photosynthèse. C'est le premier transporteur de l'enveloppe dont les constantes de cinétique et les spécificités ont été décrites, et qui a été caractérisé au niveau moléculaire (Flügge *et al.*, 1989). Il permet un échange strict de substrats entre un Pi et un triose phosphate. Les trioses phosphate exportés sont utilisés pour la synthèse de saccharose et d'acides aminés. Comme nous l'avons vu plus haut (voir p 21), il se comporte dans certaines conditions expérimentales comme un canal de type uniport.

Le TPT est codé par le génome nucléaire et possède un peptide de transit amino-terminal qui est clivé lors de l'import dans le chloroplaste. Dans son état fonctionnel, ce transporteur forme un homodimère (Flügge, 1985) et appartient au groupe des transporteurs ayant un profil de repliement de 6 + 6 hélices, identique aux transporteurs mitochondriaux (Flügge, 1985). Une comparaison des séquences des ADNc codant les transporteurs de phosphate ne montre pas

d'homologies significatives avec des protéines connues. Cette observation est une indication de la spécificité du transport du TPT.

**b. Le transporteur de phosphate/phosphoénolpyruvate (n° 4, figures 2 et 6)**

Les chloroplastes des cellules du mésophylle de plantes à métabolisme en C4 possèdent un transporteur de phosphoénolpyruvate (PEP). Ce transporteur (n° 4a, figure 6) exporte le PEP, substrat de la PEP carboxylase, vers le cytosol (Heldt *et al.*, 1991 ; Fischer *et al.*, 1994).



**Figure 6. Transporteurs de la membrane interne des chloroplastes. D'après Flügge (1998).**

1 : Transporteur de phosphate/triose phosphate (IE30) (Flügge *et al.*, 1989). 2 : Transporteur de 2-oxoglutarate/malate (DiT1) (IE45) (Menzlaff & Flügge, 1993 ; Weber *et al.*, 1995). 4a : Transporteur de phosphate/phosphoénolpyruvate des cellules du mésophylle de plantes C4 (Heldt *et al.*, 1991 ; Fischer *et al.*, 1994). 4b : Transporteur de phosphoénolpyruvate (Fischer *et al.*, 1997). 5 : Transporteur d'ATP/ADP (Heldt, 1969). 18 : Transporteur de malate/oxaloacétate (Hatch *et al.*, 1984). 19 : Transporteur de glutamate/malate (DiT2) (Woo *et al.*, 1987). 20 : Transporteur de glutamine /glutamate (Yu & Woo, 1988). 23 : Transporteur de glucose (Schäfer *et al.*, 1977). Mal : malate. Glu : glutamate. OAA : oxaloacétate. Gln : glutamine. TrioseP : triose phosphate. MDH : malate déshydrogénase. GS : glutamine synthase. PEP : phosphoénolpyruvate. 2-OG : 2-oxoglutarate. Pi : phosphate inorganique. GOGAT : glutamate synthase.

Récemment, Fischer *et al.* (1997) ont identifié un transporteur de PEP (TPP) dans les plastes ainsi que les ADNc correspondants, isolés à partir de plastes de tissus photosynthétiques et non photosynthétiques de plantes très variées (maïs, chou-fleur, tabac et *Arabidopsis*). Les séquences correspondantes sont très homologues entre elles, cependant elles ne présentent que 30 % d'identité avec le TPT. Tout comme le TPT, ce transporteur est très hydrophobe, il contient 6 domaines transmembranaires et possède un pI élevé. Ce transporteur transporte préférentiellement du phosphate inorganique (dans les conditions physiologiques) en échange avec du PEP (importé) (n° 4b, figure 6). Les trioses phosphate et le 3-APG qui sont les substrats de TPT ne sont que faiblement transportés. Sachant que les chloroplastes possèdent toute la séquence glycolytique (Journet & Douce, 1985), ils synthétisent de façon autonome le PEP. La signification physiologique de la présence de ce transporteur permettant l'import du PEP dans les chloroplastes des plantes C3 doit donc être déterminée.

Pour conclure, les deux transporteurs TPT et TPP ont des affinités comparables pour le phosphate inorganique. Ces transporteurs ne sont pas capables de transporter les hexoses phosphate. Le PPT est exprimé dans tous les tissus alors que l'expression du TPT est importante dans les tissus chlorophylliens et relativement faible dans les tissus non chlorophylliens. Ces transporteurs sont codés par le génome nucléaire et possèdent des peptides de transit *N*-terminaux. Ils forment des homodimères. Ils appartiennent au groupe des transporteurs ayant un profil de repliement 6 + 6 hélices.

#### c. Transporteur de glucose/phosphate (n° 23, figures 2 et 6)

Le transporteur de glucose permet l'exportation des hexoses (glucose, xylose, mannose ...) et des pentoses (Schäfer *et al.*, 1977) provenant de la dégradation de l'amidon. Peu d'études ont été effectuées sur ce transporteur et le gène correspondant n'a pas été identifié (Flügge, 1998).

## **2. Transport des acides dicarboxyliques**

### a. Transporteurs de 2-oxoglutarate/malate (n° 3), de glutamate/malate (n° 19) et de glutamate/glutamine (n° 20, figures 2 et 6)

#### *• Rôle des acides dicarboxyliques dans le chloroplaste*

Les transporteurs de dicarboxylates catalysent le transport de squelettes carbonés dans les plastes pour l'assimilation de l'ammoniaque. Les composés C3 exportés à partir du chloroplaste peuvent aussi servir pour la formation des acides  $\alpha$ -kétos (2-oxoglutarate) par l'intermédiaire de processus ayant lieu dans le cytosol ou la mitochondrie. Le 2-oxoglutarate est importé dans les chloroplastes pour la production de l'ammonium. Cette molécule provient de la réduction du nitrate (ce qui nécessite aussi l'entrée de nitrite) ou du cycle de la glycine/décarboxylase lors de la photorespiration. Le glutamate est un composé clé du métabolisme de l'azote, en particulier pour la synthèse des protéines dans le chloroplaste.



• *Identifications des transporteurs*

Il existe deux systèmes antiport de dicarboxylates : le transporteur de 2-oxoglutarate/malate (DiT1) qui transporte le 2-oxoglutarate dans le chloroplaste, et un transporteur de glutamate/malate (DiT2) qui exporte le glutamate (Woo *et al.*, 1987). Sachant que les deux transporteurs utilisent le malate comme substrat pour le contre-échange, le transport de 2-oxoglutarate/glutamate a lieu sans transport net de malate (Flügge *et al.*, 1996).

DiT1 est une protéine de 45 kDa localisée dans la membrane interne de l'enveloppe (Menzlaff & Flugge, 1993). L'ADNc correspondant a été cloné (Weber *et al.*, 1995). Ce transporteur possède 12 hélices transmembranaires et fonctionne probablement sous forme d'un monomère. Il permet le transport du 2-oxoglutarate, du malate ainsi que du succinate, du fumarate et du glutarate. Les acides aminés (comme le glutamate et l'aspartate) sont très faiblement transportés par ce transporteur (Weber *et al.*, 1995).

Les chloroplastes contiennent aussi un transporteur de glutamine qui utilise le glutamate comme substrat préférentiel de contre-échange (Yu & Woo, 1988). La glutamine n'est pas transportée par le DiT1 et seulement très faiblement par le DiT2. Ce transporteur n'est présent que dans les chloroplastes qui possèdent une glutamine synthase (Yu & Woo, 1988). L'ensemble de ces trois transporteurs permet l'export de la glutamine en échange avec du 2-oxoglutarate sans transport net de glutamate (ni de malate) et alimente les autres compartiments de la cellule avec l'azote réduit.

b. Transport de l'oxaloacétate (n° 18, figures 2 et 6)

Les chloroplastes de plantes à métabolisme C3 peuvent aussi importer de l'oxaloacétate (OAA) même en présence de fortes concentrations d'autres acides dicarboxyliques (Heldt & Flügge, 1987). L'OAA importé est lié à un export de malate. Ce transporteur est surtout actif dans les chloroplastes de cellules du mésophylle de plantes à métabolisme C4. En effet, il permet l'import de l'OAA (provenant de la carboxylation du PEP) pour la réduction du malate (Hatch *et al.*, 1984). La structure moléculaire de ce transporteur n'est pas connue.

c. Transporteur de glycérate/glycolate (n° 21, figures 2 et 6)

Les chloroplastes des plantes en C3 contiennent aussi un système d'antiport pour les monocarboxylates comme le glycérate, le glycolate (Robinson, 1982 ; Howitz & Mc Carty, 1985) qui sont des intermédiaires du cycle de la photorespiration. Pendant la photorespiration, le glycolate doit être rapidement exporté du chloroplaste et le glycérate importé. Les cinétiques de transport et l'équilibre de distribution des substrats dépendent du gradient de pH à travers la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (Howitz & McCarty, 1985). Ce transporteur permet l'export de 2 molécules de glycolate contre l'import d'une molécule de glycérate. Il pourrait être couplé à l'import d'un proton. Cependant, le fonctionnement exact de ce transporteur n'a pas encore été démontré. Une purification partielle de ce transporteur (à

partir de membrane interne d'enveloppe de chloroplastes de pois) a été réalisée par Howitz & McCarty (1991) par centrifugation sur gradient de glycérol. Les conditions de solubilisation du transporteur ont été déterminées. Des essais de transport de glycérate et glycolate ont été effectués sur la protéine partiellement purifiée et reconstituée dans des liposomes. Ce transporteur n'a pas encore été identifié au niveau moléculaire.

### **3. Transport d'adénylate (n° 5, figures 2 et 6)**

Les plastes possèdent un système d'antiport ATP/ADP (Heldt, 1969) qui permet de fournir de l'ATP aux plastes pour les processus biosynthétiques comme la synthèse des acides gras ou de l'amidon. Ce transporteur favorise l'import de l'ATP dans le stroma. Il pourrait permettre l'importation de l'ATP à l'obscurité ou délivrer l'ATP formé pendant la respiration aux plastes lors de leur biogénèse. Récemment, un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* codant une protéine très hydrophobe (AATP1) a été isolé (Kampfenkel *et al.*, 1995). Cette protéine contient 12 hélices transmembranaires et présente un fort degré de similarité avec le transporteur d'ATP/ADP de bactéries. Neuhaus *et al.* (1997) ont montré que la protéine AATP1 est localisée dans la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes et qu'elle correspond au transporteur d'ATP/ADP déjà identifié dans les chloroplastes par Heldt (1969).

### **4. Transport de pyruvate - Transport du pyrophosphate (n° 22, figures 2 et 6)**

Les chloroplastes de mésophylle de maïs contiennent un transporteur de pyruvate. Ce transport est dépendant de la lumière et est probablement conduit par le gradient de protons à travers l'enveloppe. Il permet l'accumulation de pyruvate dans le stroma (Flügge *et al.*, 1985).

Lunn & Douce (1993) montrent qu'il existe dans le chloroplaste un transporteur spécifique du pyrophosphate (PPi). La concentration en Pi du chloroplaste est beaucoup plus élevée (> 12 mM) que celle du cytosol (0,6 à 1,2 mM). Ainsi, le niveau de Pi dans le stroma pourrait être maintenu *in vivo* par l'import de PPi à partir du cytosol, ce transport étant effectué par un transporteur spécifique de forte affinité pour le PPi. Dans le stroma, le PPi est ensuite hydrolysé en Pi par une pyrophosphatase alcaline.

### **5. Transport d'acides aminés**

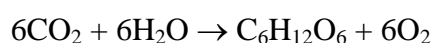
Le chloroplaste est le site majeur de la synthèse de nombreux acides aminés dont ceux de la famille de l'aspartate (asparagine, homosérine, thréonine, isoleucine, lysine) et du pyruvate. Les acides aminés aromatiques (dérivant de la voie du shikimate), la cystéine et les acides aminés dérivant du pyruvate sont produits dans le chloroplaste. La cystéine est aussi synthétisée dans le cytosol et les mitochondries (Rolland *et al.*, 1993). La méthionine est synthétisée dans le cytosol (Bryan, 1990) mais à partir de phosphohomosérine présente dans le chloroplaste. Les acides aminés synthétisés sont soit utilisés au sein du chloroplaste, soit exportés dans le cytosol de la cellule. Cependant les transporteurs impliqués dans ce processus ne sont pas connus (Flügge, 1998).

## 6. Transport de molécules impliquées dans la synthèse des lipides

Dans la plupart des systèmes membranaires des cellules animales et végétales, les lipides polaires majeurs sont les phospholipides. En revanche, les membranes des plastes sont constituées essentiellement de glycolipides : galactolipides (MGDG, DGDG) et sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG ou sulfolipide). L'enveloppe est le site de biosynthèse des glycérolipides (Joyard & Douce, 1977), elle contient la machinerie pour l'assemblage des glycérolipides spécifiques du plaste à partir d'acides gras, de glycérol et des groupes des têtes polaires. La biosynthèse des acides gras a lieu dans le stroma alors que les têtes polaires des glycérolipides sont synthétisées dans le cytosol. Les mécanismes de transfert de lipides entre les membranes du réticulum endoplasmique et l'enveloppe, entre les deux membranes de l'enveloppe, entre la membrane interne de l'enveloppe et les thylacoïdes, sont quasiment inconnus. La voie de biosynthèse des acides gras est une voie métabolique primaire car elle est présente dans toutes les cellules et elle est essentielle à la croissance. Dans les plantes, la plupart des acides gras (16:0, 18:0 et 18:1) sont synthétisés dans le plaste (Ohlrogge *et al.*, 1979). Les plantes doivent par conséquent posséder des mécanismes de transport des acides gras vers les autres sites de la cellule. Les mécanismes impliqués dans l'export des acides gras du stroma vers le cytosol pour la synthèse des phospholipides dans le réticulum endoplasmique ne sont pas connus. L'acyl-CoA synthétase, localisée dans la membrane externe de l'enveloppe, est potentiellement un bon candidat pour permettre l'exportation des acides gras vers le cytosol (Joyard *et al.*, 1998).

## 7. Transports divers

Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse qui permet la formation de glucose à partir de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O. L'équation globale de la réaction est :



Ainsi, il y a autant de molécules de CO<sub>2</sub> que de molécules d'H<sub>2</sub>O consommées, soit environ 250 µmoles/h/mg de chlorophylle. Il existe par conséquent un flux important d'eau vers le chloroplaste, qui pourrait nécessiter la présence d'un transporteur. D'autre part, le débit des flux de métabolites et d'ions à travers le chloroplaste est très important. Ainsi, il existe probablement dans l'enveloppe des osmorécepteurs permettant de maintenir l'osmolarité du stroma en agissant sur l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques.

D'autre part, les voies métaboliques présentes dans les chloroplastes font intervenir de nombreux cofacteurs qui doivent aussi traverser l'enveloppe du chloroplaste. Par exemple, la SAM (S-adénosine méthionine) est synthétisée dans le cytosol (pour revue voir Ravanel *et al.*, 1998). Or, certaines enzymes du chloroplaste comme la thréonine synthase (Curien *et al.*, 1998) ainsi que des enzymes de l'enveloppe utilisent la SAM, qui doit donc être importée dans le chloroplaste. Un autre exemple concerne le folate dont la synthèse a lieu dans les

mitochondries (Neuberger *et al.*, 1996). Il est nécessaire à la synthèse des acides nucléiques du chloroplaste. La sérine hydroxyméthyltransférase, enzyme présente dans le chloroplaste, manipule aussi le folate (Besson *et al.*, 1995). La SAM et le folate sont aussi utilisés dans le chloroplaste pour la plupart des processus de méthylation. Ces molécules doivent par conséquent être importées dans le chloroplaste. Les mécanismes impliqués dans le transport du folate et celui de la SAM ne sont pas connus actuellement.

## 8. Conclusion

Ces données donnent un bref aperçu de la complexité des systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste. De plus, la spécificité de ces transporteurs dépend probablement de l'environnement du chloroplaste (cellule, tissus). Actuellement, seuls deux transporteurs de l'enveloppe ont été totalement caractérisés : le transporteur de phosphate/triophosphate et le transporteur de 2-oxoglutarate/malate. Bien que ces différents systèmes de transport soient essentiels à l'intégration fonctionnelle des plastides dans la cellule, la fonction et la caractérisation de la plupart d'entre eux doivent être déterminées.

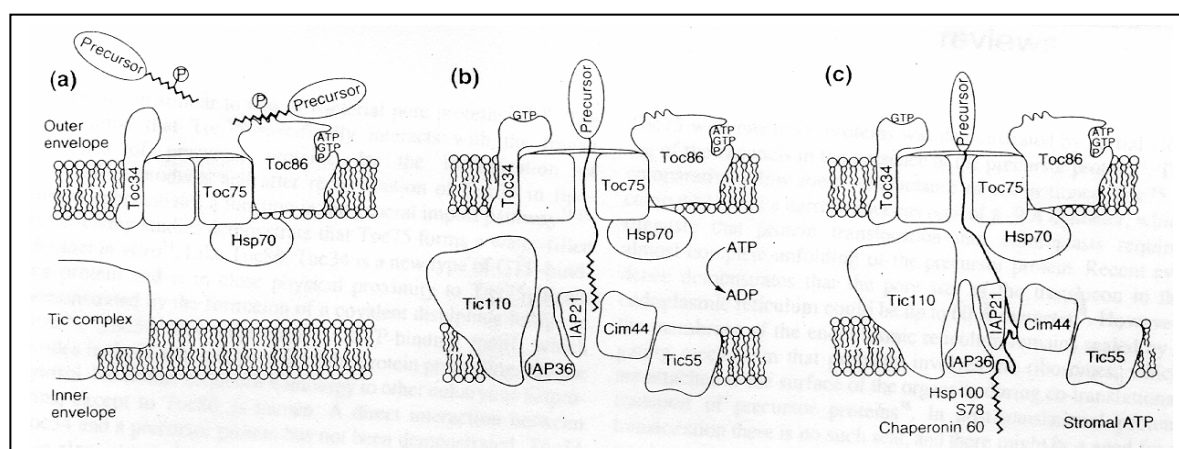
## B. Import des protéines dans le chloroplaste (n° 3, figure 2)

La plupart des protéines du chloroplaste sont codées par le génome nucléaire et doivent donc être importées dans le chloroplaste. Il existe un système d'import des protéines dans les membranes externes et internes de l'enveloppe qui permet ce passage. Sachant que de nombreux articles de revue sont disponibles sur l'import des protéines dans le chloroplaste (Gray & Row, 1995 ; Schnell, 1995 ; Heins *et al.*, 1998), nous ne parlerons ici que du modèle d'import qui a été établi.

Les protéines du chloroplaste codées par le génome nucléaire sont synthétisées avec des séquences de transit qui sont nécessaires à l'adressage vers le chloroplaste et le transfert à travers l'enveloppe du chloroplaste. Ces peptides de transit sont riches en résidus hydroxylés (sérine 19 %, thréonine 9 %) et hydrophobes (alanine 11 %, valine 7 %). Ils contiennent des acides aminés basiques et ont une charge nette positive. La figure 7 résume les étapes de ce transfert, qui ont lieu grâce aux deux complexes Tic et Toc (Tic, "Translocon at the inner chloroplast envelope" ; Toc, "Translocon at the outer chloroplast envelope"). Des études récentes suggèrent que des interactions entre le peptide de transit et les galactolipides spécifiques de la membrane externe interviennent dans l'étape initiale de la fixation des précurseurs à la surface des chloroplastes (pour revue voir Bruce, 1998). Lors de cette interaction, le peptide de transit acquiert une structure secondaire régulière qui serait reconnue par le complexe Toc.

Les protéines appartenant à ces complexes identifiées jusqu'à présent sont Toc34, Toc75, Toc86 (ou Toc160) pour le complexe Toc, et Tic110, IAP36, IAP21, Cim44, Tic55 pour le complexe Tic. Lors du transfert qui aurait lieu au niveau de sites de contact entre les deux

membranes, la protéine précurseur non structurée traverse les membranes en commençant par la partie *N*-terminale. L'énergie nécessaire à ce transfert est fournie par l'hydrolyse d'ATP. Un potentiel de membrane n'est pas nécessaire.



**Figure 7. Modèle d'import des protéines dans l'enveloppe du chloroplaste.** D'après Heins *et al.* (1998).

Lors de la première étape (figure 7a), le précurseur phosphorylé se fixe sur le récepteur Toc86, cette fixation est indépendante de l'ATP. L'activité de Toc86 peut être influencée par l'ATP, le GTP ou par phosphorylation. La déphosphorylation de la protéine précurseur permet son transfert dans le pore de transfert, Toc75 (figure 7b). Cette étape nécessite une hydrolyse d'ATP dans l'espace intermembranaire. La conformation de Toc34 est probablement affectée par la liaison du GTP, ce qui entraîne une modification des propriétés d'ouverture du canal Toc75. Au cours de cette étape, les protéines du complexe Tic orientées vers l'espace intermembranaire participent aussi au transfert (Heins *et al.*, 1998).

Ensuite, le transfert a lieu simultanément à travers les deux membranes. L'ATP du stroma est nécessaire pour permettre le passage du précurseur à travers la membrane interne de l'enveloppe. De faibles concentrations d'ATP (<100  $\mu$ M) sont nécessaires pour engager le précurseur dans le système d'import, alors que de fortes concentrations en ATP (> 1 mM) sont nécessaires pour le transfert total à travers l'enveloppe. Plusieurs chaperonnes sont associées à ce système. Com70 lierait les précurseurs sur la face cytoplasmique et les maintiendrait dans une conformation déroulée. La chaperonine Hsp70 est probablement localisée dans l'espace intermembranaire. Trois autres chaperonnes (Hsp100, S78 et la chaperonine 60) sont associées de façon périphérique à la face interne (stroma) du complexe Tic (Heins *et al.*, 1998). Le peptide de transit est ensuite éliminé dans le stroma par une protéase.

#### IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre travail avait pour objectifs de mettre au point des stratégies permettant d'identifier, tant au plan moléculaire que fonctionnel, de nouvelles protéines de l'enveloppe pouvant potentiellement être impliquées dans des systèmes de transport (canaux ioniques, transporteurs, pompes, etc...). Plusieurs possibilités ont alors été envisagées.

**La purification de protéines de l'enveloppe.** La purification de protéines impliquées dans le transport de métabolites n'est possible que lorsque les protéines sont fortement représentées. C'est ainsi que le transporteur de phosphate/triose phosphate, qui représente environ 20 % des protéines de l'enveloppe des chloroplastes, a pu être caractérisé et son fonctionnement disséqué. En revanche, les autres transporteurs ou canaux sont très probablement présents en très petite quantité. D'autre part, la caractérisation biochimique et moléculaire des fonctions portées par l'enveloppe est limitée par un problème de représentation : les protéines de l'enveloppe ne représentent qu'environ 1 % des protéines du plaste (donc 0,4 % des protéines totales). Enfin, la faible représentation de chacune des protéines de l'enveloppe et la nature même de ces protéines (hydrophobicité) limitent l'utilisation de cette technique. De plus, le choix des détergents (nature, concentration) utilisés pour solubiliser la protéine d'intérêt ne peut se faire qu'au coup par coup. Enfin, il est très difficile de suivre des activités de type canal ionique lors des différentes étapes de purification. Aussi, malgré la possibilité de préparer de larges quantités de protéines d'enveloppe de chloroplastes d'épinard, nous avons fait le choix d'une autre stratégie.

**La complémententation de mutants de levure** a montré toute son efficacité pour la caractérisation de protéines comme les canaux AKT1 et KAT1 (Sentenac *et al.*, 1992, Anderson *et al.*, 1992). Cependant, c'est une approche spécifique du substrat mais pas de la localisation subcellulaire. En effet, si cette approche s'est révélée très efficace pour l'identification de nombreux transporteurs de la membrane plasmique, elle n'a pas permis jusqu'à présent de cloner des transporteurs de l'enveloppe du chloroplaste. Il est possible que (a) le peptide de transit de la membrane interne ne puisse pas diriger ces protéines vers le plasmalemma chez la levure, ou (b) que les transporteurs de l'enveloppe soient sous représentés quantitativement dans la cellule, et que les ADNc clonés correspondent toujours aux protéines majoritaires associées à d'autres localisations subcellulaires. Cette hypothèse est la plus probable.

Les **stratégies de clonage par PCR** (basées sur l'utilisation de séquences conservées de transporteurs connus) sont d'un intérêt limité dans le cas des chloroplastes. En effet, les séquences des transporteurs du plaste déjà caractérisés montrent peu d'homologies avec les transporteurs associés aux autres systèmes membranaires. De plus, ce type d'approche n'est pas spécifique de la localisation subcellulaire et implique de la vérifier pour chaque protéine

identifiée. Une telle approche est illustrée par la caractérisation de canaux anioniques de type CLC (Lurin *et al.*, 1996) qui sont localisés dans divers systèmes membranaires, comme la membrane plasmique ou la membrane interne des mitochondries.

Nous avons tenté, sans succès, d'utiliser de telles stratégies. Nous avons alors décidé de développer une stratégie complètement différente *privilégiant avant tout la localisation dans l'enveloppe des chloroplastes* et *basée sur les propriétés physico-chimiques des transporteurs ou canaux*, à savoir leur hydrophobicité. Cette stratégie est schématisée dans la figure 8.

L'utilisation de préparations d'enveloppe de chloroplastes d'épinard présentait divers avantages. D'une part, nous étions en mesure de préparer de manière routinière des quantités importantes d'enveloppe, dans un très bon état de pureté (Douce & Joyard, 1980). L'utilisation de telles préparations augmentait de manière considérable la probabilité de caractériser des protéines nouvelles, même mineures, spécifiques de ce système membranaire.

D'autre part, si transporteurs et canaux ioniques possèdent des séquences primaires *a priori* très différentes, ils possèdent en revanche tous un ou plusieurs domaines transmembranaires hydrophobes (pour revue voir Maloney, 1994 ; Catterall, 1994). Ces domaines leur confèrent des propriétés particulières de solubilisation dans certains solvants organiques. Comme de nombreuses protéines membranaires, certaines protéines de l'enveloppe du chloroplaste peuvent être solubilisées dans des solvants organiques (Joyard *et al.*, 1982). C'est en particulier le cas du transporteur de phosphate/triose phosphate caractérisé comme la protéine majoritaire de la fraction d'enveloppe solubilisée dans des mélanges de chloroforme/méthanol.

Dans une seconde étape, il s'agissait alors de caractériser les protéines de l'enveloppe solubilisées par les solvants organiques. Nous l'avons fait au cours d'une étude systématique, par microséquençage, des protéines hydrophobes de l'enveloppe.

Le troisième volet de notre stratégie avait pour objectif la caractérisation fonctionnelle des protéines identifiées, essentiellement grâce à l'expression fonctionnelle des protéines en systèmes hétérologues et à des approches de génétique inverse. Nous avons ainsi cherché à obtenir des mutants des gènes codant les protéines d'intérêt et à analyser leurs phénotypes. Deux systèmes biologiques ont été utilisés. D'une part, nous avons recherché, par PCR, des mutants d'insertion dans la collection d'*Arabidopsis* de l'INRA de Versailles. D'autre part, partant de l'observation que chloroplastes et cyanobactéries ont des origines communes, nous avons utilisé les cyanobactéries, comme système modèle pour comprendre les fonctions des protéines homologues aux protéines chloroplastiques. Les études fonctionnelles des mutants obtenus ou des protéines surexprimées sont actuellement en cours.

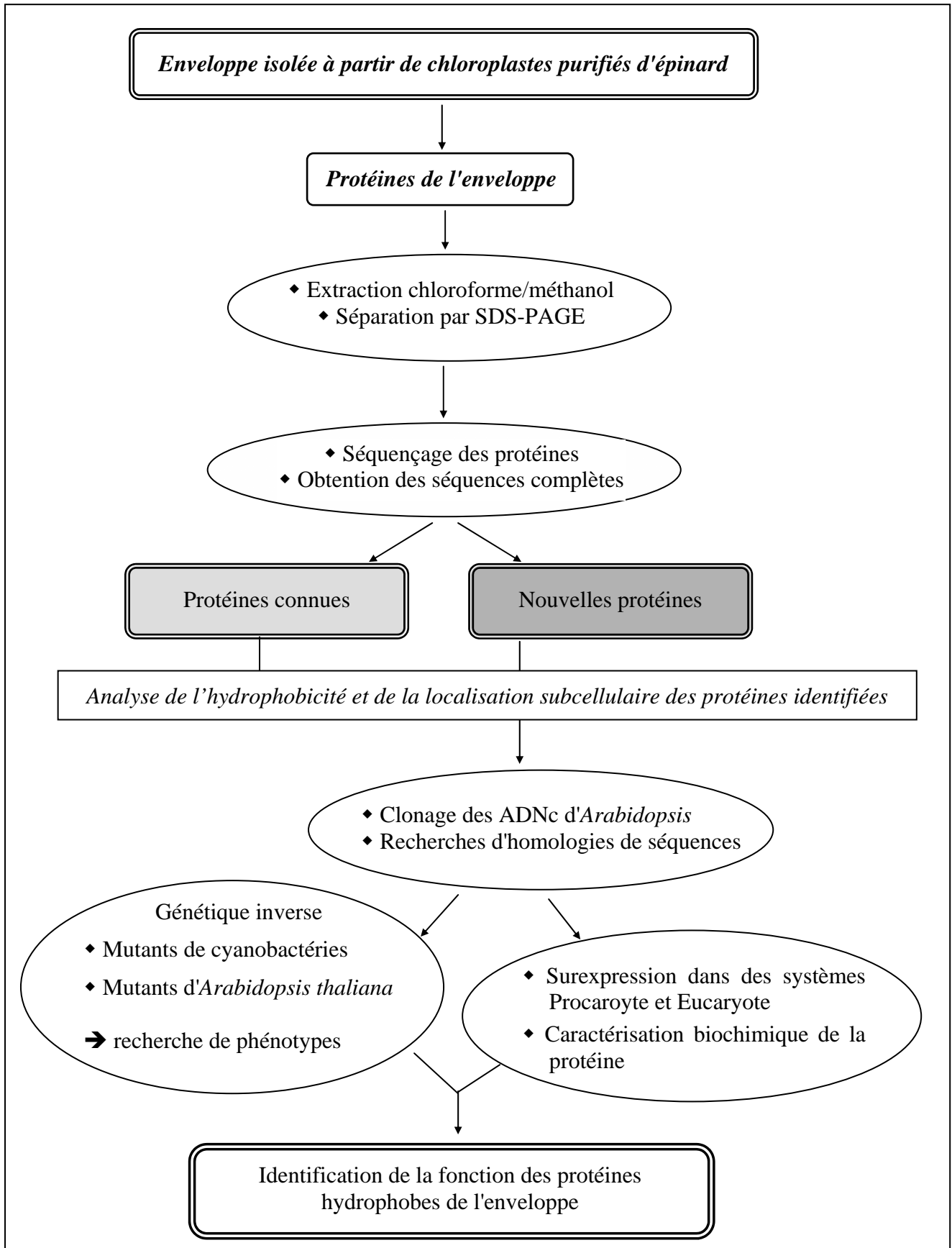


Figure 8. Approche utilisée pour la caractérisation fonctionnelle des protéines hydrophobes de l'enveloppe.



Données bibliographiques - Tableau récapitulatif

Transporteur	Activité	Caractéristiques fonctionnelles Purification, Structure Masse moléculaire	Localisation	Caractérisation moléculaire Expression fonctionnelle
<b>Transport d'ions</b>				
Porine	Pore (Flügge & Benz, 1984 ; Heiber <i>et al.</i> , 1995)	♦ $g \cong 7\text{nS}$ (KCl 1M), voltage dépendant ouvert pour $V_m < 30\text{ mV}$ (Flügge & Benz, 1984 ; Heiber <i>et al.</i> , 1995)	Membrane externe (Flügge & Benz, 1984 ; Heiber <i>et al.</i> , 1995)	-
Porine	Pore (Fuks & Homblé, 1995)	♦ $g \cong 525\text{ pS}$ (KCl 150 mM), voltage dépendant fermé pour $V_m < 0$ (Fuks & Homblé, 1995)	Membrane interne (Fuks & Homblé, 1995)	-
Canal OEP24	Large pore peu sélectif : perméable aux Pi, cations, ATP, sucres P... (Pohlmeier <i>et al.</i> , 1998)	♦ $g \cong 1,3\text{ nS}$ (dans KCl 1M) ♦ 24 kDa, homodimère (feuillet $\beta$ amphiphiles) (Pohlmeier <i>et al.</i> , 1998)	Membrane externe (Pohlmeier <i>et al.</i> , 1998)	ADNc (Pohlmeier <i>et al.</i> , 1998)
Canal anionique	Import $\text{Cl}^-/\text{NO}_2^-$ (Heiber <i>et al.</i> , 1995 ; Fuks & Homblé, 1999)	♦ $g \cong 60\text{ pS}$ (Heiber <i>et al.</i> , 1995 ; Fuks & Homblé, 1999)	Membrane interne (Heiber <i>et al.</i> , 1995 ; Fuks & Homblé, 1999)	-
Canal cationique	Import $\text{K}^+/\text{Na}^+$ (Wu & Berkowitz, 1992a, 1991 ; Wang <i>et al.</i> , 1993 ; Mi <i>et al.</i> , 1994)	♦ $g \cong 160\text{ pS}$ , non voltage dépendant (Mi <i>et al.</i> , 1994) ♦ $g \cong 100\text{ pS}$ , voltage dépendant , $\text{Mg}^{2+}$ et ATP dépendant (Heiber <i>et al.</i> , 1995) ♦ Solubilisation et reconstitution dans des liposomes (Wang <i>et al.</i> , 1993) ♦ Purification partielle, immunodétection d'un polypeptide à 62 kDa (Mi <i>et al.</i> , 1994)	Membrane interne (Wu & Berkowitz, 1992a, 1991 ; Wang <i>et al.</i> , 1993 ; Mi <i>et al.</i> , 1994)	-
$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase PEA1	Export $\text{Ca}^{2+}$ (Huang <i>et al.</i> , 1993)	♦ 90-95 kDa, 10 régions TM (Huang <i>et al.</i> , 1993)	Membrane interne (Huang <i>et al.</i> , 1993)	ADNc (Huang <i>et al.</i> , 1993)

Données bibliographiques - Tableau récapitulatif

Transporteur	Activité	Caractéristiques fonctionnelles Purification, Structure Masse moléculaire	Localisation	Caractérisation moléculaire Expression fonctionnelle
Uniport Ca <sup>2+</sup>	Import Ca <sup>2+</sup> (Kreimer <i>et al.</i> , 1985ab, Roh <i>et al.</i> , 1998)	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Uniport électrogénique (Kreimer <i>et al.</i>, 1985ab)</li> <li>♦ Import stimulé par V<sub>m</sub> &lt; 0 (Roh <i>et al.</i>, 1998)</li> </ul>	Membrane interne (Kreimer <i>et al.</i> , 1985ab, Roh <i>et al.</i> , 1998)	-
H <sup>+</sup> -ATPase	Export H <sup>+</sup> (Douce <i>et al.</i> , 1973 ; Wu & Berkowitz, 1992a ; Shingles & Mc Carty, 1994)	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ ATPase Mg<sup>2+</sup>-dépendante (Douce <i>et al.</i>, 1973)</li> <li>♦ Stimulée par K<sup>+</sup> (Wu &amp; Berkowitz, 1992)</li> <li>♦ Stimulée par Mg<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup> (Shingles &amp; Mc Carty, 1994)</li> </ul>	Membrane interne (Block <i>et al.</i> , 1983)	-
Antiport SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Import SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Export HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (Mourieux & Douce, 1978)	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Echange strict (Mourieux &amp; Douce, 1978)</li> </ul>	Enveloppe (Mourieux & Douce, 1978)	-
Ycf10	Import du HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (Rolland <i>et al.</i> , 1997)	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Gène chloroplastique</li> <li>♦ Protéine de <i>Chlamydomonas</i> : 500 aa (Rolland <i>et al.</i>, 1997)</li> <li>♦ Protéine de tabac 229 aa (Shinozaki, 1986)</li> </ul>	Membrane interne (Sasaki <i>et al.</i> , 1993)	Gène présent dans tous les génomés chloroplastiques
OEP16	Canal sélectif pour les acides aminés (Pohlmeyer <i>et al.</i> , 1997)	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ g ≅ 1,2 nS (KCl 1 M), voltage dépendant ouverture pour V<sub>m</sub> = 0</li> <li>♦ 16 kDa, homodimère, (4 feuillets β, 3 hélices α) (Pohlmeyer <i>et al.</i>, 1997)</li> </ul>	Membrane externe (Pohlmeyer <i>et al.</i> , 1997)	ADNc (Pohlmeyer <i>et al.</i> , 1997)
<b>Transports de métabolites</b>				
Phosphate/triose phosphate	Export triose P Import Pi (Flügge, 1985)	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Echange strict (Flügge, 1985)</li> <li>♦ 34 kDa, homodimère (Flügge, 1985) purification totale, 6 domaines TM (Flügge <i>et al.</i>, 1989)</li> </ul>	Membrane interne (Flügge <i>et al.</i> , 1989)	ADNc expression fonctionnelle (Flügge <i>et al.</i> , 1989)

Données bibliographiques - Tableau récapitulatif

Transporteur	Activité	Caractéristiques fonctionnelles Purification, Structure Masse moléculaire	Localisation	Caractérisation moléculaire Expression fonctionnelle
2-Oxoglutarate/ malate DiT1	Export malate Import 2-OG (Menzlaff & Flügge, 1993)	♦ 45 kDa, monomère, purification totale, reconstitution dans liposomes (Menzlaff & Flügge, 1993) 12 hélices TM (Weber <i>et al.</i> , 1995)	Membrane interne (Menzlaff & Flügge, 1993)	ADNc et expression fonctionnelle (Weber <i>et al.</i> , 1995)
Glutamate/malate DiT2	Export Glu Import Mal (Woo <i>et al.</i> , 1987)	-	Membrane interne (Woo <i>et al.</i> , 1987)	-
Glutamate/glutamine	Export Gln Import Glu (Yu & Woo, 1988)	-	Membrane interne (Yu & Woo, 1988)	-
Phosphénolpyruvate/ Pi	Export Pi/import PEP (Fischer <i>et al.</i> , 1997) Import Pi/export PEP (Fischer <i>et al.</i> , 1994)	♦ Purification partielle, 6 domaines TM, 31 kDa (Fischer <i>et al.</i> , 1997)	Membrane interne (Fischer <i>et al.</i> , 1997)	ADNc, expression fonctionnelle (Fischer <i>et al.</i> , 1997)
ATP/ADP	Export ADP Import ATP (Heldt, 1969)	♦ Monomère, 12 domaines TM (Neuhaus <i>et al.</i> , 1997)	Membrane interne (Heldt, 1969)	ADNc (Neuhaus <i>et al.</i> , 1997)
Pyrophosphate	Import de PPi (Lunn & Douce, 1993)	-	Enveloppe (Lunn & Douce, 1993)	-
Glycérate/glycolate	Import glycérate Export glycolate (Howitz & Mc Carty, 1985)	♦ Transport dépendant du pH (Howitz & Mc Carty, 1985) ♦ Purification partielle et solubilisation dans des vésicules d'asolectine (Howitz & Mc Carty, 1991)	Membrane interne (Howitz & Mc Carty, 1985)	-

Données bibliographiques - Tableau récapitulatif

Transporteur	Activité	Caractéristiques fonctionnelles Purification, Structure Masse moléculaire	Localisation	Caractérisation moléculaire Expression fonctionnelle
Oxaloacétate/malate	Import OAA Export malate (Hatch <i>et al.</i> , 1984)	-	Membrane interne (Hatch <i>et al.</i> , 1984)	-
Glucose	Export de D-glucose, hexoses (Schäfer <i>et al.</i> , 1977)	-	Membrane interne (Schäfer <i>et al.</i> , 1977)	-
Import des protéines				
Complexe Toc	Import des protéines  (revues : Heins <i>et al.</i> , 1998 ; Heins & Soll, 1998)	♦ Toc 34 ou OEP34, IAP34 (Schnell <i>et al.</i> , 1994)	Membrane externe	ADNc (Kessler <i>et al.</i> , 1994)
		♦ Toc36 ou Com44 (Wu <i>et al.</i> , 1994)	Membrane externe	ADNc (Ko <i>et al.</i> , 1995)
		♦ Toc75 (Waegemann & Soll, 1991)	Membrane externe	ADNc (Schnell <i>et al.</i> , 1994)
		♦ COM70 (ou hsp70) (Ko <i>et al.</i> , 1992)	Membrane externe	ADNc (Ko <i>et al.</i> , 1995)
		♦ Toc86 (IAP86) (Waegemann & Soll, 1991) Toc160 (Bölter <i>et al.</i> , 1998)	Membrane externe	ADNc (Kessler <i>et al.</i> , 1994)
Complexe Tic	Import des protéines	♦ Tic20 (Kouranov & Schnell, 1997)	Membrane interne	ADNc (Kouranov <i>et al.</i> , 1998)
		♦ Tic21 (Ma <i>et al.</i> , 1996)	Membrane interne	
		♦ Tic22 (Kouranov & Schnell, 1997)	Membrane interne	ADNc (Kouranov <i>et al.</i> , 1998)
		♦ IAP36 (Kessler <i>et al.</i> , 1994)	Membrane interne	ADNc (Kessler <i>et al.</i> , 1994)

Données bibliographiques - Tableau récapitulatif

Transporteur	Activité	Caractéristiques fonctionnelles Purification, Structure Masse moléculaire	Localisation	Caractérisation moléculaire Expression fonctionnelle
Complexe Tic	Import des protéines	♦ CIM44 (Ko <i>et al.</i> , 1995)	Membrane interne	ADNc (Ko <i>et al.</i> , 1995)
		♦ Tic55 (Caliebe <i>et al.</i> , 1997)	Membrane interne	ADNc (Caliebe <i>et al.</i> , 1997)
		♦ Tic110 (IEP110, IAP100) (Schnell <i>et al.</i> , 1994)	Membrane interne	ADNc (Lübeck <i>et al.</i> , 1996)

*Données bibliographiques - Tableau récapitulatif*

## MATERIEL ET METHODES GENERALES

### I. PREPARATION DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES D'EPINARD

#### A. Choix du matériel végétal

L'épinard (*Spinacia oleracea* L.) est une plante cultivée de la famille des Chénopodiacées, présentant un appareil végétatif en forme de rosette de feuilles à large limbe. L'épinard présente des avantages majeurs pour l'étude des chloroplastes :

- Il est disponible frais pratiquement toute l'année.
- C'est un végétal qui permet la préparation routinière de grosses quantités de chloroplastes intacts nécessaires à la purification d'enveloppe.

Les épinards, cultivés en plein champ, sont achetés sur les marchés locaux. Les feuilles sont ensuite triées et préparées (leurs nervures principales sont ôtées), puis lavées. Elles sont ensuite conservées une nuit en chambre froide afin d'épuiser les réserves en amidon présentes dans les plastes.

Nous avons aussi réalisé la culture des plants d'épinard (variété Symphonie) afin d'obtenir de jeunes feuilles pour certaines expériences. Les cultures sont alors effectuées en phytotron, sur vermiculite et arrosées par une solution nutritive dont la composition est décrite dans l'annexe 1. La photopériode est fixée à 10 h de jour, la température est de 22°C et l'hygrométrie de 65 %. Avant le semis, les graines sont stérilisées par immersion pendant 30 sec dans de l'éthanol 95 % [v/v], suivie d'une agitation vigoureuse dans du NaOCl 5,25 % [v/v] pendant 5 min. La suspension est diluée par ajout de 4 volumes d'eau, et l'agitation est maintenue pendant 20 min. Les graines sont ensuite rincées par agitation dans du NaOCl 0,01 % [v/v] pendant 2 h.

#### B. Préparation des chloroplastes intacts (Douce & Joyard, 1982)

Les chloroplastes sont extraits à partir de feuilles d'épinard. Toutes les opérations sont effectuées à 4°C. Les feuilles (environ 2 kg pour 2 l de milieu de broyage : saccharose 0,33 M, pyrophosphate de sodium 30 mM, SAB 1 g/l, pH 7,8) sont hachées dans un broyeur à hélice (type Waring Blendor, volume 4 l) pendant 2 à 3 sec. Le broyat est ensuite filtré sur 4 épaisseurs de gaze et une toile à bluter de 50 µm de vide de maille. Le filtrat est centrifugé à 1 200 g pendant 10 min à 4°C (Sorvall RC5, rotor GS3). Les culots sont délicatement dilués avec du milieu de lavage (saccharose 0,33 M, MOPS/NaOH 10 mM, pH 7,8). Cette suspension, enrichie en chloroplastes, est filtrée sur toile à bluter de 50 µm de vide de maille. Afin d'éliminer les contaminants extraplastidiaux et les chloroplastes cassés, la suspension est déposée sur un gradient discontinu de Percoll (Percoll 40 % [v/v], saccharose 0,33 M, MOPS/NaOH 20 mM, pH 7,8, et Percoll 80 % [v/v], saccharose 0,33 M, MOPS/NaOH 20

mM, pH 7,8) et centrifugée à 3000 g pendant 20 min (Sorvall RC5, rotor HS4). Les chloroplastes intacts sont localisés à l'interface des couches de Percoll 40 et 80 % [v/v], tandis que les chloroplastes cassés et le matériel non chloroplastique restent au-dessus de la couche de Percoll 40 % [v/v]. Pour éliminer le Percoll, les chloroplastes intacts sont dilués par 6 à 7 volumes de milieu de lavage et centrifugés à 4 000 g pendant 5 min (Sorvall RC5, rotor GS 3). Le culot est récupéré et cette opération de lavage est répétée (centrifugation à 3 000 g pendant 5 min ; Sorvall RC5, rotor SS34).

Lorsque les expériences nécessitaient de petites quantités de chloroplastes intacts, par exemple pour les études d'interactions avec l'annexine, nous avons utilisé la méthode de Mouriaux (1981). Les chloroplastes sont obtenus à partir de feuilles matures du marché lavées et dénervurées ou à partir des 6 premières feuilles de jeunes plants d'épinard. Toutes les opérations suivantes se déroulent à 4°C. Les feuilles (100 g) sont broyées dans 300 ml de tampon d'extraction (sorbitol 330 mM, EDTA 2 mM, HEPES/KOH 30 mM, pH 7,5). Le broyat est ensuite filtré sur 8 épaisseurs de gaze et réparti dans les tubes SS34. Après une centrifugation de 1,5 min à 1 500 g (Sorvall RC5, rotor SS34), les culots sont repris dans du tampon d'extraction, poolés et répartis en deux tubes. Ces tubes sont centrifugés à 120 g pendant 45 sec, les surnageants sont récupérés et centrifugés à 1 500 g pendant 1,5 min. Les culots sont repris dans du tampon d'extraction afin d'obtenir un volume final de 4 ml. Les gradients continus de Percoll (sorbitol 330 mM, EDTA 2 mM, Percoll 50 % [v/v], HEPES/KOH 50 mM pH 7,8, SAB 1,5 g/l) sont préparés la veille par centrifugation dans un rotor vertical (Sorvall RC5, rotor SS90) pendant 1 h 40 à 20 000 g. Après avoir prélevé 2 ml au sommet des gradients, la suspension de chloroplastes est déposée délicatement, et centrifugée (Sorvall RC5, rotor SS90) 10 min à 5 000 g. Les chloroplastes intacts ainsi purifiés, sont dilués et lavés dans du tampon d'extraction, puis concentrés par une dernière étape de centrifugation de 2,5 min à 1 500 g (Sorvall RC5, rotor SS34).

### **C. Traitement des chloroplastes intacts par la thermolysine (Joyard *et al.*, 1983)**

La thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus* est une protéase qui s'est révélée particulièrement utile pour analyser les polypeptides situés sur la face externe de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes intacts (Joyard *et al.*, 1983). La suspension de chloroplastes intacts et purifiés (concentration finale : 1 mg de chlorophylle/ml) est incubée pendant 1 h à 4°C dans un milieu contenant du saccharose 330 mM, MOPS/NaOH 10 mM (pH 7,8), CaCl<sub>2</sub> 1 mM et des concentrations variables de thermolysine (20 à 100 µg/ml). La protéolyse est arrêtée par addition d'EGTA 10 mM. Afin d'éliminer la thermolysine et les quelques chloroplastes éventuellement cassés au cours du traitement, la suspension de chloroplastes est centrifugée à 3 000 g (Sorvall RC5, rotor HS4) pendant 20 min sur un coussin de Percoll 40 % [v/v], puis les culots de chloroplastes intacts sont lavés deux fois dans du milieu de lavage.



#### **D. Purification de l'enveloppe des chloroplastes (Douce *et al.*, 1973)**

Les chloroplastes intacts et purifiés (traités ou non à la thermolysine) sont placés dans un milieu hypotonique (MgCl<sub>2</sub> 4 mM, MOPS/NaOH 10 mM, pH 7,8) qui contient des inhibiteurs de protéases (acide  $\epsilon$ -aminocaproïque 0,5 mM, benzamidine/HCl 1 mM et PMSF 1 mM). Le volume de milieu hypotonique est environ 10 fois supérieur à celui des chloroplastes. La concentration finale en saccharose est ainsi abaissée brutalement à moins de 0,1 M : par osmose, l'eau pénètre dans les chloroplastes qui éclatent. Les ions Mg<sup>2+</sup> permettent le maintien de l'association des membranes des thylacoïdes et préviennent ainsi la contamination de l'enveloppe par des vésicules membranaires issues des thylacoïdes. La suspension de chloroplastes cassés est déposée sur un gradient discontinu de saccharose (saccharose 0,6 M et 0,93 M dans du tampon MgCl<sub>2</sub> 4 mM, MOPS/NaOH 10 mM, pH 7,8) et centrifugée à 72 000 g pendant 1 h (Beckman L2 65B, rotor SW28). Après centrifugation trois fractions sont ainsi obtenues : (a) une couche supérieure du gradient qui contient les enzymes solubles du chloroplaste, (b) un culot vert qui contient essentiellement des thylacoïdes, et (c) l'enveloppe des chloroplastes localisée à l'interface des couches de saccharose 0,6 M et 0,93 M. Cette fraction est diluée 3 fois avec du milieu de lavage (MOPS/NaOH 10 mM pH 7,8, acide  $\epsilon$ -aminocaproïque 0,5 mM, benzamidine/HCl 1 mM et PMSF 1 mM), puis concentrée par centrifugation à 113 000 g pendant 1 h (Beckman L2 65B, rotor SW28). Les culots sont récupérés et conservés dans l'azote liquide. Le rendement d'extraction moyen correspond à 1-3 mg de protéines d'enveloppe par kg de feuilles d'épinard. L'enveloppe obtenue est dépourvue de tous contaminants provenant du cytosol ou des thylacoïdes. Seules quelques protéines solubles du stroma (comme la Rubisco) sont présentes dans les fractions de membranes d'enveloppe (Douce *et al.*, 1973 ; Joyard & Douce, 1980).

#### **E. Préparation de fractions d'enveloppe enrichies en membranes externe et interne (Block *et al.*, 1983)**

Les chloroplastes sont purifiés selon la technique décrite ci-dessus, cependant les milieux de broyage et de lavage contiennent du mannitol à la place du saccharose (mannitol 0,33 M, MOPS/NaOH 30 mM, pH 7,8, SAB 1 g/l et mannitol 0,33 M, MOPS/NaOH 10 mM, pH 7,8 respectivement). Les chloroplastes purifiés sont placés dans un milieu hypertonique (mannitol 0,7 M, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, MOPS/NaOH 20 mM, pH 7,8). Le choc osmotique entraîne le décollement des deux membranes qui sont alors séparées par de très larges espaces (Carde *et al.*, 1982). La suspension de chloroplastes est alors placée dans la chambre d'une presse de type Yeda. La pression interne de la chambre est portée à 5 bars à l'aide d'azote, puis le pointeau de la presse est ouvert afin de permettre l'écoulement de la suspension de chloroplastes. La variation de pression qui en résulte permet de rompre les deux membranes. Afin d'éliminer les chloroplastes encore intacts et les thylacoïdes, la suspension obtenue est centrifugée à 12 000 g (rotor SS34, Sorvall) pendant 10 min. Le surnageant (renfermant

essentiellement les protéines solubles et les vésicules d'enveloppe) est récupéré, dilué pour avoir 80 ml dans le tampon suivant : MOPS/NaOH 10 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, acide ε-aminocaproïque 1 mM, benzamidine/HCl 1 mM, PMSF 1 mM, puis déposé sur un gradient discontinu de saccharose (saccharose 1 M, 0,65 M et 0,4 M dans du tampon MOPS/NaOH 10 mM (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub> 4 mM). Après centrifugation à 95 000 g (Beckman L2 65B, rotor SW27) pendant 1 h 30 à 4°C, la membrane interne est récupérée à l'interface des couches de saccharose 1 M et 0,65 M, et la membrane externe entre les couches 0,65 M et 0,4 M (Block *et al.*, 1983a). Les différentes fractions sont diluées 3 fois dans du milieu de lavage (MOPS/NaOH 10 mM pH 7,8, acide ε-aminocaproïque 0,5 mM, benzamidine/HCl 1 mM, PMSF 1 mM), et ensuite centrifugées à 113 000 g (Beckman L2 65B, rotor SW 27) pendant 1 h à 4°C. Les culots obtenus sont récupérés et conservés dans l'azote liquide.

### **F. Préparation de noyaux à partir de jeunes feuilles d'épinard (Watson & Thompson, 1986)**

Les jeunes feuilles (environ 30 g) sont découpées et broyées avec un Polytron dans 100 ml de tampon d'extraction (héxylène glycol 0,5 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM, MOPS/NaOH 20 mM pH 7). Le broyat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze et sur une toile à bluter de 50 µm de maille. Du Triton X-100 (25 % [v/v]) est ajouté au filtrat goutte à goutte afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 % [v/v]. La suspension est ensuite filtrée successivement sur toile à bluter de 50 µm puis de 20 µm, puis centrifugée 10 min à 10 000 g (Sorvall, rotor HB4). Les culots sont repris dans du tampon d'extraction en présence de Triton X-100 0,5 % [v/v], filtrés sur une toile à bluter de 20 µm puis déposés sur un gradient discontinu de Percoll 30 et 60 % [v/v] dans du tampon d'extraction et en présence de Triton X-100 0,5 % [v/v]. Après une centrifugation de 30 min à 400 g, les noyaux, localisés à l'interface des deux gradients et dans le Percoll 60 % [v/v], sont récupérés, lavés dans le tampon d'extraction et stockés à -80°C dans du tampon d'extraction contenant du glycérol 20 % [v/v].

## **II. TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES**

### **A. Dosage des protéines**

La concentration en protéines est déterminée selon la technique de Lowry *et al.* (1951) ou selon la méthode de Bradford (1976). Une gamme étalon est effectuée pour chaque série de dosage avec la sérum-albumine bovine (SAB).

### **B. Solubilisation des protéines dans des détergents**

L'utilisation de détergents permet de solubiliser les protéines de l'enveloppe enchâssées dans la bicouche lipidique. L'enveloppe est diluée dans une solution contenant du tampon

MOPS/NaOH 50 mM (pH 7,8), du DTT 0,1 mM et diverses concentrations de détergents (Triton X-100 et CHAPS), avec un rapport final de 0,8 mg de protéines par ml. Après une incubation de 30 min sur la glace, le mélange est centrifugé pendant 15 min à 100 000 g (Beckman, rotor SW50). Le surnageant contient les protéines de l'enveloppe solubilisées par le détergent, alors que le culot contient les protéines insolubles. Le culot est repris dans du tampon MOPS/NaOH 50 mM (pH 7,8), DTT 0,1 mM afin d'avoir un volume identique à celui du surnageant. Les deux fractions sont ensuite analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes et par marquage immunologique.

### **C. Pontage chimique de protéines**

Le réactif chimique utilisé est le BS<sup>3</sup> ou bis (sulfosuccinimidy) subérate. Il crée un lien covalent entre deux cystéines de la protéine spatialement proches. Les protéines sont diluées dans du tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) et traitées par ajout de BS<sup>3</sup> à une concentration finale de 1 mM. Le BS<sup>3</sup> est préparé extemporanément dans du tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4). Après 30 min d'incubation à température ambiante, la réaction est arrêtée par l'ajout d'un sixième de volume de tampon éthanolamine 20 mM, *N*-éthylmaléimide 20 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4). Les protéines sont ensuite analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes.

### **D. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

#### **1. Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes (Chua, 1980)**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer les polypeptides en fonction de leur masse moléculaire, après dénaturation par le sodium dodécyl sulfate (SDS) et la chaleur. Les échantillons sont dilués avec du tampon de dépôt : Tris/HCl 50 mM (pH 6,8), glycérol 10 % [v/v], SDS 1 % [v/v], bleu de bromophénol 0,01 % [v/v] et DTT 25 mM. Puis ils sont portés à ébullition pendant 2,5 min pour achever la solubilisation et la dénaturation des protéines. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration contenant 5 % [v/v] d'acrylamide, et d'un gel de séparation contenant 12 % [v/v] ou 15 % [v/v] d'acrylamide.

L'électrophorèse est conduite à voltage constant (200 V), dans du tampon de migration de composition suivante : Tris 25 mM, glycine 0,192 M (pH 8,3), SDS 0,1 % [v/v] et la migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel.

#### **2. Coloration d'un gel au bleu de Coomassie**

Dans les conditions normales (gel analytique), le gel est coloré par incubation de 30 min dans une solution de colorant (acide acétique 10 % [v/v], isopropanol 25 % [v/v], bleu de Coomassie 2,5 g/l (Coomassie brilliant-blue R250, Sigma). Il est ensuite décoloré par lavage dans un mélange de méthanol 40 % [v/v], acide acétique 7 % [v/v].

Lorsque le gel a été effectué en vue du séquençage interne des protéines, la coloration du gel au bleu de Coomassie est effectuée de la manière suivante. Le SDS est tout d'abord éliminé du gel par un lavage pendant 30 min dans une solution d'éthanol 30 % [v/v] et d'acide acétique 0,5 % [v/v]. Le gel est ensuite coloré pendant 20 à 30 min par lavage dans le mélange suivant : bleu de Coomassie R250 0,1 % [p/v], éthanol 30 % [v/v], acide acétique 0,5 % [v/v]. La décoloration s'effectue dans de l'éthanol 30 % [v/v] pendant environ 1 h. Ensuite, pour arrêter la décoloration, le gel est placé dans une solution d'éthanol 5 % [v/v] et incubé 12 h à 4°C. Les bandes peuvent alors être découpées et utilisées pour le microséquençage des protéines.

### **3. Coloration d'un gel au nitrate d'argent (Merril *et al.*, 1981)**

Le seuil de détection de la coloration au bleu de Coomassie est d'environ 0,1 µg de protéines. La coloration des protéines au nitrate d'argent permet de visualiser de plus faibles quantités de protéines, car elle permet d'augmenter la sensibilité de détection d'un facteur 10 environ.

Après l'électrophorèse, le gel est lavé 30 min dans un milieu renfermant de l'acide acétique 10 % [v/v], et du méthanol 40 % [v/v], puis trois fois 10 min dans une solution contenant de l'éthanol 10 % [v/v] et de l'acide acétique 5 % [v/v] afin d'éliminer le SDS et pour fixer les polypeptides dans le gel. Le gel est ensuite incubé 5 min dans une solution d'oxydation :  $K_2Cr_2O_7$  3,4 mM,  $HNO_3$  3,2 mM, puis rincé 4 fois 30 sec dans de l'eau distillée. Il est alors coloré 30 min dans une solution d' $AgNO_3$  12 mM, puis rincé pendant 15 sec dans l'eau distillée. La révélation s'effectue dans une solution contenant  $Na_2CO_3$  0,28 M, formaldéhyde 0,18 % [v/v], pendant 10 à 15 min sur une table lumineuse. La révélation est arrêtée par incubation du gel dans de l'acide acétique 1 % [v/v]. Le gel est conservé dans de l'eau distillée.

## **E. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immunomarquage**

### **1. Technique de transfert**

Cette technique permet de transférer les protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane.

Le gel est incubé 10 min dans un tampon de transfert sans SDS (Tampon Laemmli : Tris 25 mM, glycine 0,192 M, pH 8,3) contenant du méthanol 20 % [v/v]). Une membrane de nitrocellulose (BA 85, Schleicher & Schuell) est mouillée dans de l'eau distillée puis dans le tampon de transfert dépourvu de SDS et déposée sur 3 feuilles de papier Whatman préalablement trempées dans le même tampon. Le gel est ensuite déposé sur la membrane et recouvert par trois feuilles de papier Whatman imbibées de tampon. Afin d'éviter la présence de bulles d'air qui affectent le transfert, une pipette Pasteur est roulée sur l'ensemble. Le tout est placé entre deux claies et installé dans l'appareil de transfert rempli de tampon de transfert additionné de SDS 0,1 % [v/v]. Le transfert s'effectue à 90 V pendant 1 h à 4°C. Après le transfert, la membrane de nitrocellulose est rincée dans de l'eau distillée.

Afin de contrôler l'efficacité du transfert, la membrane est colorée au Rouge Ponceau (0,4 g dans 200 ml d'un mélange H<sub>2</sub>O/acide acétique, 198/2 [v/v] pendant 1 min. La membrane est ensuite rincée à l'eau distillée. Les protéines apparaissent en rouge, et la coloration s'élimine par des lavages successifs dans l'eau distillée.

Lorsqu'un séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine doit être effectué, la technique de transfert est différente. Une membrane de type PVDF (Pro-Blot, Applied Biosystems) est d'abord imbibée de méthanol pur puis trempée dans du tampon de transfert (composition décrite ci-dessus).

## **2. Coloration de la membrane au bleu de Coomassie pour séquençage de la partie N-terminale**

Après transfert des protéines sur membrane de PVDF, la membrane est rincée à l'eau distillée puis imbibée de méthanol pur. Elle est ensuite colorée pendant 15 sec à 1 min avec une solution de bleu de Coomassie (bleu de Coomassie R250 0,1 % [p/v], méthanol 40 % [v/v], acide acétique 0,5 % [v/v]). La décoloration s'effectue dans une solution aqueuse renfermant de l'éthanol 30 % [v/v], pendant 30 min en surveillant l'apparition des protéines majeures. La membrane est rincée abondamment à l'eau distillée puis est séchée à l'air.

## **3. Immunomarquage**

Après transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose est rincée dans de l'eau distillée puis saturée dans un tampon TBST (TBS [NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM pH 7,5] + Triton X-100 0,05 % [v/v]) contenant du lait écrémé déshydraté 5 % [p/v] pendant 1 h, sous agitation. La membrane est ensuite incubée avec le premier anticorps dilué dans du TBST, 2 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C. La membrane est rincée 3 fois 10 min dans du tampon TBST, puis incubée avec le deuxième anticorps (anticorps dirigé contre les immunoglobulines G de lapin, couplé à la phosphatase alcaline (Sigma, dilution 1/20 000<sup>ème</sup>) ou à la peroxydase (Tebu, dilution 1/3 000<sup>ème</sup>) pendant 1 h à température ambiante.

a. Révélation par mesure de la chimiluminescence. Après incubation en présence du deuxième anticorps (couplé dans ce cas à la peroxydase de radis noir ; Tebu, dilution 1/3 000<sup>ème</sup>), la membrane est lavée 3 fois 10 min dans du tampon TBST. L'activité de la peroxydase est révélée dans un milieu alcalin (Tris/HCl 100 mM, pH 8,5) auquel sont ajoutés extemporanément du luminol (3-aminophalhydrazine) 12,5 mM et de l'acide P-coumarique 0,2 mM, en présence d'une goutte d'eau oxygénée. En milieu alcalin, la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol. Le luminol oxydé est dans un état excité et revient à son état fondamental en émettant de la lumière bleue (chimiluminescence). L'acide P-coumarique, composé phénolique, joue le rôle de catalyseur et améliore l'émission de lumière d'un facteur 100 (Durrant, 1990). La membrane de nitrocellulose est incubée 1 min avec la solution de révélation, puis est exposée contre un film d'autoradiographie sensible à la lumière bleue

(Hyperfilm ECL, Amersham) à température ambiante. Après différents temps d'exposition (quelques sec à 30 min), le film est développé. Cette technique permet d'augmenter la sensibilité de détection par rapport à la révélation par la méthode utilisant la phosphatase alcaline.

b. Révélation par mesure de l'activité phosphatase alcaline. Dans ce cas, on utilise un deuxième anticorps couplé à la phosphatase alcaline (Sigma, dilution 1/20 000<sup>ème</sup>). Après 1 h d'incubation, la membrane est lavée deux fois 10 min dans du TBST, puis 10 min dans le tampon de la phosphatase alcaline (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris/HCl 100 mM pH 9,5). La révélation est effectuée en ajoutant à ce tampon les deux substrats de l'enzyme : NBT (nitro-bleu de tétrazolium) 60µg/ml et BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate) 100 µg/ml. Le BCIP, déphosphorylé par la phosphatase alcaline, réagit avec le NBT qui précipite et se colore (rose-violet). La réaction enzymatique est arrêtée par lavage de la membrane à l'eau distillée.

## **F. Purification des immunoglobulines**

### **1. Purification des IgG à partir du sérum (St Blancard *et al.*, 1981)**

Le sérum brut obtenu après immunisation d'un lapin contre une protéine ou un peptide est centrifugé 15 min à 48 000 g, à 4°C. Le surnageant est dessalé sur une colonne PD10 (Pharmacia) préalablement équilibrée par du tampon A (Tris/HCl 25 mM (pH 8,8), NaCl 35 mM). L'éluat est alors déposé sur une colonne échangeuse d'anions DEAE Trisacryl M<sup>+</sup> préalablement équilibrée avec le même tampon A. Les immunoglobulines sont éluées dans le tampon A, les autres protéines du sérum restent fixées sur la colonne échangeuse d'anions. Le pool d'immunoglobulines obtenu est concentré par une précipitation au sulfate d'ammonium 40 % [p/v]. Après une centrifugation de 15 min à 1 200 g à 4°C, le culot est repris dans 12 ml de tampon A et la solution obtenue est dessalée sur une colonne PD10 (Pharmacia) équilibrée dans du tampon A.

### **2. Immunopurification des IgG spécifiques (Rolland *et al.*, 1993)**

Préparation de la colonne d'affinité "protéine-sépharose 4B" : 1 g de matrice CnBr-Sépharose 4B (Pharmacia) est placé dans une colonne et traité par 200 ml d'une solution de HCl 1 mM. Le gel est ensuite rincé par 10 ml de tampon de fixation (NaCl 0,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,3), puis incubé sous agitation en présence de la protéine (1 mg) pendant 2 h à 20°C. Le milieu d'incubation est ensuite remplacé par du tampon de fixation sur une colonne de dessalage. Après élution du tampon de fixation contenant la protéine, les sites de fixation libres du gel sont saturés par 10 ml d'une solution de glycine 0,2 M (pH 8), la nuit à 4°C. La colonne est rincée par le même volume de tampon de lavage (NaCl 0,5 M, acétate de sodium 0,1 M, pH 4) puis par du tampon de fixation. La colonne est prête pour purifier les immunoglobulines spécifiques de la protéine greffée sur la matrice. Dans le cas de la

purification des immunoglobulines dirigées contre l'annexine recombinante, le tampon de fixation a été remplacé par le tampon d'élution de la purification sur colonne de nickel (imidazole 1 M, NaCl 0,5 M, Tris/HCl 20 mM, pH 7,9).

Les immunoglobulines sont diluées dans du tampon de dilution (EDTA 0,1 M, NaCl 150 mM, glycérol 10 % [v/v], Tris/HCl 100 mM pH 7,5). Cette fraction est déposée (30 ml/h) sur la colonne d'affinité "protéine-Sépharose" et recyclée 3 fois. La colonne est rincée par 6 ml de tampon de dilution puis par 8 ml de tampon B (NaCl 0,5 M, glycérol 10 % [v/v], glycine 0,1 M, pH 5). Les immunoglobulines fixées spécifiquement sur la colonne d'affinité sont éluées par 8 ml de tampon C (glycérol 10 % [v/v], glycine 0,1 M, pH 2,5) et 8 ml de tampon D (éthylène glycol 20 % [v/v], glycine 0,1 M, pH 2,5). Les différents éluats sont récupérés dans des fioles contenant 2 ml de Tris/HCl 1 M (pH 8) afin de neutraliser rapidement les solutions.

### **G. Obtention des séquences N-terminales et des séquences internes**

Le microséquençage des protéines a été réalisé au Laboratoire de Chimie des Protéines (DBMS, CEA-Grenoble) sur des protéines séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Ces protéines correspondent aux extractions de protéines de l'enveloppe effectuées dans des mélanges de solvants organiques. Après migration et coloration du gel (voir paragraphe II D, p. 45), les bandes correspondant aux protéines étudiées sont découpées. Pour chaque protéine, des digestions enzymatiques ont été effectuées en utilisant différentes enzymes : l'endoprotéinase Lys-C, l'endoprotéinase Asp-N ou la trypsine. Les peptides libérés lors des digestions sont extraits de la matrice d'acrylamide et séparés par HPLC (phase inverse, voir Adessi *et al.*, 1995). Les peptides purifiés sont ensuite séquencés selon la méthode de la dégradation d'Edman (Laursen, 1971).

En vue du séquençage par MS/MS (Morris *et al.*, 1996), le morceau de gel contenant la protéine d'intérêt est découpé, puis lavé et incubé en présence de trypsine comme indiqué dans Wilm *et al.* (1996). Les peptides tryptiques sont extraits du gel par l'addition de 10 µl d'acétonitrile 50 %, séchés sous vide, resolubilisés dans 2 à 3 µl d'acide formique (0,1 %), dessalés par une micro-colonne de phase inverse (Zip-Tip, Millipore), et nébulisés dans un spectromètre de masse de type Quadrupole-TOF (Q-TOF).

Les microséquences N-terminales ont été obtenues après transfert des protéines (séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes) sur membrane PVDF (Pro-Blot, Applied Biosystems) et coloration de la membrane au bleu de Coomassie (voir paragraphe II D, p. 45). La bande correspondant à la protéine est découpée et séquencée selon la méthode de la dégradation d'Edman (Laursen, 1971).

### III. TECHNIQUES D'ETUDE DES LIPIDES

#### A. Extraction des lipides totaux de l'enveloppe

Les lipides totaux de l'enveloppe sont extraits selon la méthode de Bligh & Dyer (1959). A 200 µl d'enveloppe sont ajoutés successivement 750 µl d'un mélange chloroforme/méthanol 1/2 [v/v], 250 µl d'eau et 250 µl de chloroforme pur. Le mélange est homogénéisé par agitation puis centrifugé 10 min à 14 000 g, afin de séparer deux phases. La phase aqueuse supérieure est éliminée. La phase inférieure organique, contenant les lipides et les caroténoïdes, est prélevée et évaporée sous argon pour la conservation des lipides.

#### B. Séparation des lipides par chromatographie sur couches minces (Kates, 1986)

Les lipides neutres ou polaires (solubilisés dans un mélange chloroforme/méthanol 2/1 [v/v]) sont séparés sur couche mince de gel de silice (plaques de gel de silice, MERCK) par chromatographie bidimensionnelle en utilisant les mélanges de solvants suivant :

Sens 1 : chloroforme/méthanol/eau (65/25/4) [v/v]

Sens 2 : chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50/20/10/10/5) [v/v]

Après la première séparation, la couche mince est légèrement séchée sous argon puis déposée dans un dessiccateur sous argon. Le lendemain, la plaque est déposée dans le second mélange de solvant (sens 2) de manière à ce que la migration du solvant s'effectue perpendiculairement au sens de la première migration. L'ensemble des lipides est révélé par de l'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique) 0,2 % [v/v] dissous dans du méthanol. Les glycolipides sont détectés spécifiquement par une coloration à l' $\alpha$ -naphtol, et les phospholipides à l'aide d'un réactif à base de molybdate qui colore le groupement phosphate (Kates, 1986).

#### C. Purification des lipides de l'enveloppe par chromatographie sur colonne de silice

Les compositions lipidiques de l'enveloppe et des thylacoïdes étant similaires, nous avons utilisé les membranes des thylacoïdes obtenus en plus grande quantité pour purifier les lipides spécifiques des plastes. Les lipides totaux sont extraits selon la méthode de Bligh & Dyer (1959). Après évaporation complète de la phase organique sous argon, les lipides sont solubilisés dans du chloroforme pur avant d'être purifiés par chromatographie sur colonne de silice comme décrit par Dorne *et al.* (1987).

L'acide silicique (6 g, soit 80 fois la masse de lipides attendue) est solubilisé dans du chloroforme et déposé dans une colonne de verre. Les lipides totaux sont alors déposés au sommet de la matrice de silice. Les différents lipides sont séparés par des éluions successives dans les solvants organiques suivants : (1) 200 ml de chloroforme pur (élution des pigments), (2) 195 ml d'un mélange chloroforme/acétone (150/45) [v/v], (3) 100 ml d'un mélange chloroforme/acétone (100/60) [v/v] (élution du MGDG), (4) 150 ml d'acétone pur (élution du



MGDG et du DGDG), puis (5) 150 ml de méthanol pur (élution du DGDG, SQDG, et du TGDG). Les différentes fractions d'élution sont évaporées sous argon et solubilisées dans un mélange de chloroforme/méthanol 2/1 [v/v]. Le MGDG et le SQDG sont ensuite purifiés par chromatographie sur couches minces de silice (comme décrit ci-dessus). Une révélation par les différents réactifs (ANS,  $\alpha$ -naphthol, molybdate) permet l'identification des lipides. Il faut ensuite repérer sur les couches minces les régions contenant les lipides et recueillir indépendamment le gel de silice correspondant à chaque zone. Les lipides sont élués de la poudre de gel de silice par une extraction selon Bligh & Dyer (1959). La quantification des différents lipides purifiés a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (colonne BPX70, SGE). Le témoin interne utilisé correspond au C<sub>21</sub>.

#### **D. Dosage des chlorophylles (Arnon, 1949)**

La concentration en chlorophylle d'une suspension de chloroplastes est mesurée après solubilisation des chlorophylles dans l'acétone 80 % [v/v] : 10  $\mu$ l de suspension sont ajoutés à 10 ml d'acétone 80 % [v/v] dans un tube en verre puis centrifugés à 3 000 g pendant 5 min (Sorvall RC 2B, rotor SS34). Le surnageant est prélevé et l'absorbance mesurée à 652 nm (A<sub>652</sub>, référence acétone 80 % [v/v]) avec un spectrophotomètre Uvikon 810 (Kontron). La concentration en chlorophylles totales (a + b) est obtenue par la relation suivante :

$$A_{652} \times 26 = X \text{ mg de chlorophylle/ml de suspension de chloroplastes}$$

### **IV. TECHNIQUES D'ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES**

#### **A. Techniques d'analyse de l'ADN**

##### **1. Extraction de l'ADN total**

Les feuilles d'épinard (5 g) sont broyées dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre obtenue est décongelée dans 20 ml de tampon de lyse (Tris/HCl 50 mM pH 8, urée 7 M, NaCl 0,35 M, EDTA 20 mM, SDS 1 % [v/v], phénol 5 % [v/v]), à température ambiante. Les protéines sont éliminées au cours de 3 extractions successives : l'échantillon est mélangé à un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) [v/v] en présence de SDS 0,5 % [v/v], et centrifugé 15 min à 3 000 g. La phase aqueuse est prélevée et une extraction identique est effectuée. La troisième extraction est effectuée à l'aide de chloroforme pur. Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse sont alors précipités par addition d'un volume d'isopropanol en présence de 0,1 volume de NaOAc 3 M (pH 5,3). Les acides nucléiques sont solubilisés dans de l'eau distillée puis traités (1 h à 37°C) par la RNase A (25  $\mu$ g/ml) afin d'éliminer les ARN. La RNase est éliminée par une extraction au phénol/chloroforme (1/1) [v/v], suivie d'une extraction au chloroforme. L'ADN est précipité par ajout d'un dixième de volume de NaOAc 3M (pH 5,3) et d'un volume d'isopropanol. Après une incubation de 1 h dans la glace, l'ADN est centrifugé à 14 000 g à 4°C. Le culot est

rincé par 300 µl d'éthanol 70 % [v/v] puis séché et repris dans du tampon TE (Tris/HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) et conservé à -20°C.

## **2. Extraction de l'ADN chloroplastique**

La suspension de chloroplastes purifiés est diluée par un volume de tampon de lyse (Tris/HCl 0,1 M pH 7,5, EDTA 50 mM, SDS 1 % [v/v]) et vortexée. Les protéines sont éliminées au cours de deux extractions successives par un volume de phénol/chloroforme (1/1) [v/v] et une 3<sup>ème</sup> extraction avec un volume de chloroforme (les centrifugations se font à température ambiante, à 1 500 g pendant 10 min). L'ADN chloroplastique contenu dans le dernier surnageant subit un traitement par la RNase A (25 µg/ml) pendant 1 h à 37°C. La RNase est éliminée par une extraction au phénol/chloroforme (1/1) [v/v], suivie d'une extraction au chloroforme. L'ADN est ensuite précipité comme décrit précédemment, le culot est dissout dans du tampon TE et conservé à -20°C.

## **3. Extraction de l'ADN nucléaire**

Les noyaux obtenus à partir des jeunes feuilles d'épinard (voir paragraphe I F, p. 44) sont lysés par ajout d'un volume de tampon de lyse (Tris/HCl 0,2 M pH 8, EDTA 50 mM, NaCl 1 M, sarkosyl 2 % [p/v]), puis incubés pendant 1 h en présence de protéinase K 0,5 mg/ml à 37°C. Cette incubation est prolongée 2 h après ajout d'une quantité équivalente de protéinase K. L'ADN nucléaire est ensuite obtenu après extractions successives par un volume de phénol, puis un volume de phénol/chloroforme (1/1) [v/v] et un volume de chloroforme, suivies d'une précipitation à l'isopropanol.

## **4. Extraction de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose**

Afin de purifier un fragment d'ADN issu d'une digestion, les différents fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les inserts sont localisés sous UV et le fragment à purifier est découpé. Nous avons utilisé le système JETSORB (Genomed Inc.) pour purifier l'ADN. Cette purification repose sur l'interaction spécifique de l'ADN avec une matrice d'affinité (matrice de verre Sephaglas<sup>TM</sup> FP).

## **5. Synthèse d'oligonucléotides**

Les oligonucléotides de synthèse sont utilisés comme amorces par la polymérase de *Thermophilus aquaticus* lors de l'amplification de l'ADN par PCR. La synthèse des oligonucléotides a été réalisée par la société Génome-Express (Grenoble).

## **6. Amplification *in vitro* de fragments d'ADN**

Afin d'amplifier les fragments d'ADN clonés dans les différents plasmides utilisés (plasmide pET15b, pETY3a, Novagen ; plasmide pBlueScript(KS), Stratagène), nous avons utilisé la *Taq* polymérase associée à la technique d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'ADN matrice est dilué dans 100 µl de milieu de PCR (Tris/HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DTT 1 mM, Tween-20 0,05% [v/v], 50 µM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), 100 pmoles de chaque amorce spécifique, 1 unité de *Taq* polymérase). Après homogénéisation, la phase inférieure est couverte par 50 µl d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter toute évaporation. L'amplification est arrêtée après 10 à 15 cycles pour les clonages, ou après 45 cycles pour le criblage de la banque de mutants d'*A. thaliana*. Chaque cycle comprend :

- 1 min de dénaturation à 94°C
- 1 min d'hybridation de 50 à 65°C selon le T<sub>m</sub> des oligonucléotides
- 1 min d'élongation à 72°C

La réaction se termine par un dernier cycle plus long avec 5 min à 72°C. La durée de l'étape d'élongation est ajustée en fonction de la taille du fragment à amplifier (1 min d'élongation par kilobase). L'efficacité de la réaction d'amplification est testée par analyse de 10 µl du mélange réactionnel par électrophorèse sur gel d'agarose.

## 7. Techniques d'hybridation

a. Marquage de l'ADN double brin. Les marquages sont effectués selon la méthode décrite par Feinberg & Vogelstein (1983). Nous avons utilisé le système "Rediprime DNA labelling system" (Amersham). Un mélange de nucléotides 9-mers contenant des séquences aléatoires est utilisé comme amorce pour la polymérase de Klenow (provenant de *E. coli*). L'ADN (2,5 à 25 ng dans 45 µl) est dénaturé 5 min à 95-100°C, puis incubé 10 min à 37°C en présence des amorces en excès molaire, d'une unité de Klenow, de 0,2 µM de [<sup>32</sup>P]-dCTP (50 µCi, Amersham) et des 3 autres dNTP froids. Avant d'être utilisé pour une hybridation, l'ADN doit être dénaturé 5 min à 95°C puis placé 5 min à 0°C.

b. Marquage des oligonucléotides. Les oligonucléotides de synthèse sont dépourvus de groupement phosphate à leur extrémité 5'. Il est donc possible de les marquer par transfert du γ-<sup>32</sup>P provenant du [<sup>32</sup>P]-ATP en utilisant la polynucléotide kinase du bactériophage T4. Le mélange suivant est réalisé : 1 µl d'oligonucléotides à 10 pmoles/µl, 2 µl de tampon (Tris/HCl 0,5 M pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, EDTA 1 mM pH 8, DTT 50 mM, spermidine/HCl 1 mM), 5 µl de [<sup>32</sup>P]-ATP (10 mCi/ml, 5000 Ci/mmmole), 11 µl d'eau et 1 µl de polynucléotide kinase. L'ensemble est incubé 45 min à 37°C puis 10 min à 68°C afin d'inactiver l'enzyme. Les oligonucléotides sont ensuite précipités par ajout de 100 µl de NH<sub>4</sub>OAc 5M et 300 µl d'éthanol. Après une centrifugation de 20 min à 14 000 g et à 4°C, le culot est rincé par 300 µl d'éthanol 70 % [v/v], puis séché 30 min et repris dans 100 µl de tampon TE.

c. Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon. Après migration de l'ADN sur gel d'agarose, le gel est placé 20 min dans une solution d'HCl 0,25 M. Après un lavage rapide dans de l'eau distillée, le gel est incubé 30 min dans une solution de NaOH 0,4 N. Le gel est ensuite déposé sur trois couches de papier Whatman imbibé de NaOH 0,4 N. La membrane de Nylon

(Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) est déposée sur le gel. L'ensemble est alors recouvert de trois feuilles de papier Whatman imbibées de NaOH 0,4 M, de papier absorbant (5 cm d'épaisseur), d'une plaque en verre et d'une masse d'environ 500 g. Après 3 h de transfert, la membrane de Nylon est stockée dans un film de Nylon à 4°C jusqu'à utilisation.

Lorsque des sondes oligonucléotidiques doivent être utilisées pour l'hybridation ultérieure, le gel d'agarose (après migration) est placé directement dans la solution de NaOH 0,4 N, sans traitement préalable par l'HCl 0,25 N.

d. Préhybridation, hybridation et rinçages. Les sites de fixation libres de la membrane de Nylon sont saturés au cours d'une incubation de 1 h à 55°C (hybridation hétérologue) ou 65°C (hybridation homologue) dans du tampon de préhybridation (SSC 6X (SSC 1X : NaCl 150 mM, citrate de sodium 15 mM), Denhardt 5X, SDS 0,5 % [v/v], ADN de sperme de saumon 100 µg/ml). La sonde radioactive, marquée au  $\gamma$ -<sup>32</sup>P, est dénaturée (5 min à 95°C puis 5 min dans la glace), puis ajoutée au milieu de préhybridation. L'hybridation est effectuée sur la nuit à 55°C. Le filtre de Nylon est ensuite rincé par 2 lavages de 10 min dans du tampon SSC 2X, SDS 0,1 % [v/v], à température ambiante pour le premier lavage, puis à 55°C (ou à 65°C) pour le second lavage.

Les filtres encore humides, sont disposés entre deux films de Nylon (type Saran), puis mis en exposition dans une cassette du Phosphoimager, environ 2 h, ou en autoradiographie sur la nuit à -80°C.

*Conditions de préhybridation et d'hybridation avec les sondes oligonucléotidiques :*

L'hybridation est effectuée à 37°C pendant 3 h dans un milieu contenant : SSC 6X, tétrasodium pyrophosphate 1 mM, SDS 0,5 % [v/v], Denhardt 5X, ADN de sperme de saumon 100 µg/ml. Après dénaturation, les sondes oligonucléotidiques sont ajoutées au milieu d'hybridation (SSC 6X, tétrasodium pyrophosphate 1 mM, Denhardt 1X, SDS 0,1 % [v/v], ADN de sperme de saumon 100 µg/ml). L'hybridation est effectuée à 28°C, pendant 20 h. Les membranes de Nylon sont rincées 3 fois 5 min dans du tampon SSC 6X contenant du tétrasodium pyrophosphate 1 mM. Deux autres lavages de 30 min peuvent être nécessaires, un premier lavage à 28°C dans du tampon SSC 3X, tétrasodium pyrophosphate 1 mM et un second lavage à 50°C dans du tampon SSC 6X, tétrasodium pyrophosphate 1 mM.

L'ADN sur les filtres est déshybridé par une incubation de 30 min à 45°C dans une solution de NaOH 0,4 N. Cette étape est suivie d'une neutralisation de 30 min à 45°C dans un tampon contenant Tris/HCl 0,2 M (pH 7,5), SDS 0,1 % [v/v], SSC 0,1 X. Les filtres sont ensuite placés entre deux films de Nylon (type Saran) et mis en exposition comme décrit ci-dessus.

## **8. Technique de séquençage de l'ADN**

Les séquences ont été réalisées par la société Génome-Express (Grenoble). L'analyse des séquences est réalisée à l'aide de banques de données et de différents programmes accessibles

sur Internet (Expasy tools, BLAST, *Arabidopsis thaliana* Data Base, ...).

## **B. Techniques de criblage d'une banque d'ADNc dans $\lambda$ gt11 à l'aide d'anticorps ou d'une sonde nucléique**

La banque que nous avons utilisée est une banque d'expression dans  $\lambda$ gt11 qui a été préparée à partir d'ARNm de feuilles d'épinard prélevées sur le terrain (Dumas *et al.*, 1993). Le criblage est réalisé sur une souche bactérienne de type *E. coli* Y1090r<sup>-</sup> qui possède (a) le répresseur de *lacZ* (inhibé par l'ajout d'IPTG), (b) une déficience dans la biosynthèse de la protéase lon (ce qui augmente la stabilité de la protéine de fusion) et de *supF* (ce qui supprime les mutations induites par la bactérie hôte pour bloquer la lyse par les phages).

Les phages constituant la banque sont conservés à 4°C dans du tampon de dilution (Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) contenant du chloroforme 5 % [v/v].

### **1. Titration de la banque d'ADNc**

Le titre d'une banque est susceptible de changer au cours du temps. Il est donc nécessaire de le déterminer avant chaque nouveau criblage.

Une série de dilution des phages est réalisée (de 10<sup>4</sup> phages/ $\mu$ l à 10 phages/ $\mu$ l) dans du tampon de dilution des phages. Les bactéries Y1090r<sup>-</sup> sont mises en culture dans milieu LB liquide contenant du maltose 0,4 % [p/v] et du MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Les bactéries sont récupérées en milieu de phase de croissance exponentielle, centrifugées 5 min à 500 g et resuspendues dans du MgSO<sub>4</sub> 10 mM. On incube 150  $\mu$ l de cette suspension bactérienne avec 1  $\mu$ l de phages recombinants (pour chaque dilution) 10 min à température ambiante et 10 min à 37°C. Cette suspension est ensuite diluée dans 3 ml de milieu LB contenant de l'Agar 0,5 % [p/v] ou Top-Agar (maintenu à 43°C), puis coulée sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB et de l'Agar 1,5 % [p/v]. La formation des plages de lyse est initiée à 42°C. Après 3 à 4 h, les plages de lyse sont comptées et le titre de la banque déterminé (nombre de phages/ml).

### **2. Criblage de la banque d'ADNc**

Les bactéries (150  $\mu$ l) sont incubées avec 1  $\mu$ l de phages recombinants à la dilution souhaitée comme décrit ci-dessus pour la détermination du titre. La formation des plages de lyse est initiée à 42°C sans IPTG. Dans ces conditions, la formation des plages de lyse n'est théoriquement pas affectée par la présence de protéines recombinantes.

a. Utilisation d'anticorps polyclonaux. Après 3 à 4 h d'incubation, les plages de lyse sont visibles. L'expression des protéines de fusion est induite à 37°C par ajout sur chaque boîte d'un filtre de nitrocellulose (BA 85, Schleicher & Schuell) préalablement incubé dans une solution d'IPTG 10 mM et séché. Après une incubation de 3 h à 37°C (expression des protéines de fusion), les membranes sont retirées des boîtes qui sont conservées à 4°C. Les sites de fixation libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés 12 h à 4°C dans du

tampon TBS Triton X-100 0,05 % [v/v] (ou TBST) contenant du lait écrémé 5 % [p/v]. La révélation des protéines par les anticorps spécifiques s'effectue selon la méthode décrite dans le paragraphe II E 3b (p. 48). Les plages de lyse ainsi révélées sont localisées sur les boîtes de Pétri, prélevées et incubées dans 400 µl de tampon de dilution des phages. Les phages positifs sont purifiés par des criblages successifs.

**b. Utilisation d'une sonde nucléique.** Après la période d'incubation à 42°C, on dépose sur les boîtes pendant 1 min un filtre Nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham). Les filtres sont retirés et déposés 1 min dans une solution de dénaturation (NaOH 1,5 M, NaCl 1,5 M), 10 min dans une solution de neutralisation (Tris/HCl 0,5 M pH 7,2, NaCl 1,5 M, EGTA 1 mM) et 5 min dans du tampon SSC 3X. Les filtres sont séchés sur du papier Whatman et les clones positifs sont révélés après hybridation avec une sonde marquée au  $\gamma$ -<sup>32</sup>P selon le protocole décrit dans le paragraphe IV A 7d (p. 53). Des cycles de criblages successifs sont réalisés jusqu'à obtention d'un clone pur.

## V. TECHNIQUES D'EXPRESSION PROCARYOTE

### A. Principe de la surexpression des protéines chez *Escherichia coli*

Nous avons utilisé le système d'expression procaryote développé par Studier *et al.* (1990). L'ADNc codant la protéine à exprimer est inséré dans le plasmide sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 et en 3' de la séquence de liaison aux ribosomes (Shine-Dalgarno) de la protéine majeure de la capsid du phage T7. La polymérase T7 possède une forte affinité pour son promoteur. De plus, la vitesse d'élongation des brins d'ARN par la polymérase est 5 à 10 fois supérieure à celle de la polymérase bactérienne, ce qui garantit des taux élevés de synthèse d'ARNm.

Les souches BLR(DE3) (Novagen) et BL21(DE3)pLysS (Novagen) ont été utilisées lors des surexpressions pour les raisons suivantes :

- Elles possèdent une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7. Ce gène est porté par le bactériophage  $\lambda$ DE3 qui est intégré dans le chromosome de la bactérie. Ce fragment comporte aussi le promoteur *lacUV5* en amont du gène de l'ARN polymérase T7 et le gène *lacI*. Le produit du gène *lacI* bloque le promoteur *lacUV5*. L'IPTG est un inhibiteur de ce répresseur : sa présence active le promoteur *lacUV5* et déclenche la synthèse de la polymérase. Toutefois, le blocage par ce système lac n'est pas total et permet donc un niveau basal d'expression de la protéine cible même en l'absence d'IPTG.
- Ces souches sont déficientes dans la synthèse de deux protéases codées par les gènes *lon* et *omp*, ce qui limite la dégradation de la protéine recombinante.

- La souche BLR(DE3) est *recA*<sup>-</sup>, c'est-à-dire déficiente dans les processus de recombinaison. Le plasmide intégré dans la bactérie ne peut pas être modifié par des phénomènes de recombinaison homologue.

- La souche BL21(DE3)pLysS contient le plasmide pACYC184(pLysS) (Chang & Cohen, 1978 ; Rose, 1988) qui code pour le lysosyme. Le lysosyme est un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase T7 et permet donc d'inactiver la polymérase produite avant l'induction par l'IPTG. La présence de ce plasmide permet de limiter les problèmes liés à une éventuelle toxicité de la protéine cible en diminuant le niveau d'expression basal de la protéine recombinante.

Nous avons utilisé le vecteur pET-15b (Novagen) pour exprimer les protéines d'*Arabidopsis thaliana* IE18 et l'annexine sous forme mature ou sous forme de fusion avec une étiquette poly-histidine. Les protéines IE16-1 et p16-2 d'*Arabidopsis thaliana* présentant dans leur séquence nucléique de nombreux codons rares AGA ou AGG codant pour l'arginine, nous avons utilisé le vecteur pETY-3a pour surexprimer ces protéines. Le vecteur pETY-3a est un vecteur pET3a (Studier *et al.*, 1990) dans lequel a été inséré le gène *argU* codant pour l'ARNt déficient.

## **B. Construction des vecteurs d'expression procaryote**

### **1. Construction des plasmides recombinants**

L'EST codant pour l'annexine d'*Arabidopsis thaliana* identifiée par Gidrol *et al.* (1996) a été fournie par J. Giraudat (ISV, Gif-sur-Yvette). La totalité de la région codante de l'annexine d'*A. thaliana* a été amplifiée par PCR en utilisant les oligonucléotides suivant : 5' GGACATA TGCACGAGGCGACTCTTAAGG 3' et 5' GCGGATCCCTACTTCCCGTAATCTCCAC 3'. Le fragment amplifié a été inséré par un clonage à bouts francs dans un plasmide intermédiaire, le plasmide pBlueScript(KS), afin d'être entièrement séquencé. Le fragment a été ensuite inséré dans le vecteur pET-15b après digestion par les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI*.

Les régions codantes pour les protéines IE16-1 et p16-2 ont été obtenues à partir d'amplification par PCR sur de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant les oligonucléotides suivant : 5' TTGACGCATATGGCCTCCTACACCCCGACG 3' et 5' TGG AGATCTTTAGAGTTGTCTACCGGCGG 3' pour IE16-1, 5' CTCCAACATATGGGTGAT GATTCCGTCGATG 3' et 5' ATTGGATCCTCAAAGGACTTGCCTATCAGC 3' pour p16-2. Les fragments amplifiés ont été insérés par un clonage à bouts francs dans le plasmide pBlueScript(KS), puis dans le vecteur pETY-3a après digestion par les enzymes de restriction *NdeI* et *BgIII* pour IE16-1, *NdeI* et *BamHI* pour p16-2.

La séquence codante pour la protéine IE18 a été obtenue par séquençage d'une EST (clone ABRC, 9604T7, GeneBank, numéro d'accèsion T21692), provenant du "*Arabidopsis* Biological Resource Center" (DNA stock Center, Ohio State University, USA). Les

oligonucléotides utilisés ont été les suivants : 5' CGGCCCATGGTAAGTACGGTGGTGGC G 3' et 5' GGTGGATCCTCAA AATTCATGT TTTCTTC 3' pour le clonage de IE18 sous forme mature, 5' CGGATTAATGTAAGTACG GTGGTGGCG 3' et 5' GGTGGATCCTCAA AATTCATGTTTCTTC 3' pour le clonage de IE18 sous forme de fusion. Les fragments amplifiés ont été insérés par un clonage à bouts francs dans le plasmide pBlueScript(KS), puis dans le vecteur pET-15b après digestion par les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* pour la forme mature, *AseI* et *BamHI* pour la forme fusionnée à la séquence poly-histidine.

La souche DH5 $\alpha$  a été utilisée pour le clonage des ADNc et la production de plasmides recombinants. Cette souche contient la partie  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase et permet d'avoir une sélection blanc/bleu avec des plasmides contenant la partie complémentaire de la  $\beta$ -galactosidase. D'autre part, cette souche est déficiente pour les processus de recombinaison (*recA*).

## 2. Préparation de l'ADN des plasmides

Les bactéries recombinantes sont cultivées (250 rpm, 37°C) pendant 12 h dans du milieu LB contenant 100  $\mu$ g/ml de carbénicilline. Pour la préparation de l'ADN de plasmide, nous avons utilisé le système Flexi-prep (Pharmacia) qui repose sur une lyse alcaline des bactéries et une purification de l'ADN sur une matrice d'affinité.

## C. Préparation et transformation des bactéries compétentes

Deux méthodes de transformation ont été utilisées, une méthode chimique utilisant un traitement au CaCl<sub>2</sub>, et une méthode physique, l'électroporation permettant d'obtenir de meilleurs rendements de transformation.

### 1. Méthode utilisant le traitement au CaCl<sub>2</sub>

Les bactéries compétentes sont préparées par un traitement au CaCl<sub>2</sub> (Maniatis *et al.*, 1982). Les bactéries (DH5 $\alpha$ , BLR(DE3), BL21(DE3)pLysS) sont cultivées dans 12 ml de milieu LB jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,5. Après 10 min dans la glace, les bactéries sont centrifugées 5 min à 3 000 g et remises en suspension dans 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM froid. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 3 000 g, le culot de bactéries est repris dans 400  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 100 mM froid.

Les plasmides (environ 10 ng) sont mélangés à 200  $\mu$ l de bactéries compétentes pendant 40 min dans la glace. Un choc thermique de 1,5 min à 42°C permet la transformation des bactéries par les plasmides. La suspension bactérienne est alors incubée 1 h à 37°C dans 0,8 ml de milieu SOC (Bactotryptone 2 % [p/v], Bacto yeast extract 0,5 % [p/v], NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucose 20 mM), puis étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu LB et de la carbénicilline (concentration finale : 100  $\mu$ g/ml). Dans ces conditions, seules les bactéries ayant incorporé un plasmide se multiplient.



## 2. Technique d'électroporation

Les bactéries (souches DH5 $\alpha$  et XL1blue) sont cultivées dans 500 ml de milieu LB jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,5. Après une incubation de 15 min dans la glace, elles sont concentrées par centrifugation à 4 000 g pendant 5 min à 4°C. Les bactéries sont lavées deux fois dans de l'eau stérile glacée dans un volume de 500 ml puis de 250 ml. Les bactéries sont ensuite mises en suspension dans 10 ml de glycérol 10 % [v/v] froid, centrifugées 15 min à 4 000 g et reprises dans 1,5 ml de glycérol 10 % [v/v] froid. Les bactéries sont ensuite congelées dans l'azote liquide par aliquotes de 500  $\mu$ l et stockées à -80°C.

Les plasmides (1 à 3 ng) sont mélangés à 50  $\mu$ l de bactéries électrocompétentes pendant 1 à 2 min dans la glace. La suspension est ensuite transférée dans une cuve d'électroporation (0,2 cm entre les deux électrodes, Bio-Rad). Un choc électrique (0,8 kV) permet l'introduction du plasmide dans la bactérie. Les cellules sont ensuite rapidement diluées dans 1 ml de milieu SOC (voir composition décrite ci-dessus), et incubées 1 h à 37°C avant d'être étalées sur milieu LB-carbénicilline (100  $\mu$ g/ml).

## D. Conditions d'expression

Les bactéries recombinantes sont mises en culture dans du milieu LB à 37°C jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne 0,5. L'induction de la synthèse de la protéine recombinante est déclenchée par ajout d'IPTG 1mM. Lorsque la protéine synthétisée est insoluble (corps d'inclusion) en condition standard, diverses conditions d'induction sont testées. Ces conditions incluent des variations de température (18, 30, 37 et 42°C), diverses concentrations d'IPTG (0, 0,1 et 0,4 mM) et des durées d'induction variables.

## E. Technique de purification des protéines recombinantes contenant une extension N-terminale poly-histidine

Les protéines recombinantes exprimées sous forme de fusion avec une séquence poly-histidine en N-terminal peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité. En effet, lorsque les histidines sont déprotonées à pH 7,9, la séquence poly-histidine se lie, avec une forte affinité, aux cations bivalents (Ni<sup>2+</sup>) immobilisés sur des colonnes de chélation des métaux. Les protéines non fixées sont alors éliminées par des lavages successifs et la protéine étiquetée est éluée de la colonne par des tampons contenant des concentrations croissantes d'imidazole, puis par élution du nickel fixé sur la colonne en présence d'EDTA.

### 1. Préparation des protéines

Un culot de bactéries contenant la protéine recombinante conservé à -80°C (correspondant à 400 ou 800 ml de culture induite) est dilué dans du tampon de fixation froid (Tris/HCl 20 mM pH 7,9, imidazole 5 mM, NaCl 0,5 M) (16 ml de tampon pour 400 ml de culture bactérienne). Ce tampon peut aussi contenir un détergent (Triton X-100 0,1 % [v/v]) ou de l'urée 6M

suivant la nature ou la solubilité de la protéine recombinante. Les bactéries sont lysées et leur ADN est détruit par des cycles successifs de sonication à 0°C (120 V, 1 min). La sonication est poursuivie jusqu'à ce que le milieu devienne limpide. Le lysat est ensuite centrifugé à 39 000 g pendant 20 min à 4°C (Sorvall RC2 B, rotor SS34) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant qui contient les protéines solubilisées est immédiatement déposé sur la colonne d'affinité.

## 2. Préparation de la colonne

La matrice (Novagen) est rincée dans 3 volumes (volume de colonne) d'eau, chargée en nickel par 5 volumes de tampon de charge (NiSO<sub>4</sub> 50 mM) et équilibrée par 3 volumes de tampon de fixation (Tris/HCl 20 mM pH 7,9, imidazole 5 mM, NaCl 0,5 M). Lorsque l'utilisation d'un détergent ou d'urée s'avère nécessaire, tous les tampons utilisés pour purifier cette protéine étiquetée contiennent le même additif (Triton X-100 0,1 % [v/v] ou urée 6 M).

## 3. Chromatographie d'affinité

L'échantillon protéique est déposé sur la matrice et la fraction protéique non retenue est déposée à nouveau au sommet de la colonne afin que toute la protéine se fixe sur la matrice. Le débit utilisé est de l'ordre de 10 volumes de colonne/h. Les protéines peu ou non affines pour les ions Ni<sup>2+</sup> sont éluées par des concentrations croissantes d'imidazole. La colonne est lavée successivement par 10 volumes de tampon de fixation, puis 6 volumes de tampon de lavage (Tris/HCl 20 mM pH 7,9, imidazole 60 mM, NaCl 0,5 M). L'élution s'effectue par addition de 6 volumes de tampon d'élution (Tris/HCl 20 mM pH 7,9, imidazole 1 M, NaCl 0,5 M). Les fractions d'élution sont collectées (0,5 ml par fraction). Une deuxième élution est effectuée par l'ajout de 6 volumes d'EDTA 160 mM, NaCl 0,5 M, Tris/HCl 20 mM pH 7,9. Ce tampon permet de décrocher le nickel fixé sur la colonne et de conserver la matrice jusqu'à une utilisation ultérieure. Les protéines contenues dans les différentes fractions sont ensuite analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes et par marquage immunologique.

# VI. TECHNIQUES D'EXPRESSION EUCARYOTE

## A. Description du système cellules d'insecte/baculovirus

En général, la culture de lignées eucaryotes est plus délicate et plus exigeante que celle de bactéries. Le temps de doublement des cellules est de 20 h environ (20 min pour *E. coli*), ce qui entraîne un gros investissement en temps pour l'ensemble d'un projet de surexpression d'une protéine. Le système eucaryote présente l'avantage de réaliser les modifications post-traductionnelles (glycosylation, prénylation, phosphorylation ...) des protéines, ce qui n'est pas le cas d'un système d'expression procaryote. Le système utilisant le baculovirus est un système d'expression transitoire. Le baculovirus est un virus en forme de bâtonnet de 40-50

nm de diamètre et de 200-400 nm de long qui infecte les insectes au cours de leur stade larvaire. Le génome des baculovirus est un ADN bicaténaire circulaire d'environ 130 kpb.

Un des baculovirus les plus utilisés aujourd'hui pour la synthèse de protéines a été originalement isolé à partir de larves d'*Autographa californica*. Ce virus est l'AcMNPV (*Autographa californica* Multi Nuclear Polyhedrosis Virus). Le cycle de réplication du virus est complexe. Dans la nature, les particules virales sont protégées par une gangue protectrice, le polyèdre. Les polyèdres sont des corps d'inclusion protéiques formés majoritairement d'une protéine codée par le génome viral, la polyédrine. Les insectes ingèrent les polyèdres qui sont dissous dans le suc intestinal alcalin. Les virions libérés fusionnent avec les cellules et les nucléocapsides sont amenées jusqu'au noyau où l'ADN viral est libéré. Deux formes différentes de particules virales sont produites au cours de l'infection : les particules virales extracellulaires qui vont bourgeonner à la surface des cellules et les particules virales incluses dans les polyèdres. Environ 10 h après l'infection, des particules virales bourgeonnent à la surface des cellules infectées et vont infecter d'autres cellules de l'hôte. Les corps d'inclusion commencent à se former dans le noyau environ 18 h après l'infection et s'y accumulent jusqu'à la lyse cellulaire (4 à 5 jours). Deux protéines sont synthétisées en quantité importante au cours de la phase tardive de l'infection : la protéine P10 et la polyédrine. Les promoteurs de ces deux gènes sont des promoteurs forts. En fin d'infection, la polyédrine peut représenter jusqu'à 50 % des protéines cellulaires. La polyédrine est essentielle à la formation des corps d'inclusion permettant la dissémination des virus dans la nature. En revanche, pour des cellules en culture, les produits des gènes P10 et polyédrine ne sont indispensables ni à l'infection, ni à la réplication du virus.

## **B. Production de baculovirus recombinants**

Le principe de l'expression repose sur la production d'un baculovirus recombinant ayant intégré dans son génome la séquence d'ADNc codant la protéine à exprimer sous le contrôle de l'un des promoteurs forts (on utilise en général celui de la polyédrine).

La nature, la taille et la complexité d'une protéine vont directement influencer son niveau d'expression dans les cellules d'insecte. Les protéines membranaires sont généralement exprimées à des taux plus faibles que les protéines solubles ou excrétées. Les quantités de protéines membranaires purifiées dans ce système ne dépassent pas 2 à 3 mg par litre de culture.

On ne peut pas directement travailler sur le virus à cause de la grande taille de son génome. On utilise alors un vecteur bactérien appelé vecteur de transfert. Ce plasmide contient un site de clonage en 3' du promoteur fort de la polyédrine situé au centre de séquences flanquantes issues de l'ADN viral. Le gène de la  $\beta$ -galactosidase a été inséré dans ce vecteur, ce qui permet une sélection positive des virus recombinants. Une recombinaison homologue *in situ*

permet l'intégration dans le génome viral. Des cellules en culture (lignée *Sf9*, *Spodoptera frugiperda*) sont cotransfectées par un mélange d'ADN viral et de vecteur de transfert. Dans la cellule hôte, les régions de l'ADN viral de part et d'autre de la polyédrine se recombinent avec les régions homologues sur le vecteur de transfert. On utilise de l'ADN viral préalablement modifié : l'ADN est linéarisé et un fragment du gène de la polyédrine a été enlevé par digestion. Ainsi seuls les virus recombinants, qui deviennent circulaires après la recombinaison, seront infectieux.

## C. Protocoles expérimentaux utilisés

Nous avons utilisé le système commercialisé par Invitrogen (MaxBac2). Les protocoles décrits ci-dessous sont principalement extraits du livret descriptif du fournisseur.

### 1. Milieu et lignée cellulaire

Nous avons utilisé la lignée cellulaire *Sf9*. Les cellules sont cultivées dans du milieu de Grace complété en lysat de levure (Yeastolate) et en  $\alpha$ -lactalbumine (Biowhittaker) avec les additifs suivants (= milieu complet) :

Sérum de veau foetal	10 % [v/v]
Gentamycine	10 $\mu$ g/ml (antibiotique)
Pluronic F-68	0,1 % [p/v] (surfactant)
Amphotéricine B	2,5 $\mu$ g/ml (fongicide)

### 2. Culture

Les cellules *Sf9* peuvent être maintenues en boîte (elles sont alors adhérentes) ou en suspension. Leur temps de doublement est d'environ 20 h en phase exponentielle de croissance à une température de 27°C. Les cellules d'insecte peuvent être cultivées dans une étuve simple sans impératif hygrométrique ou de concentration en CO<sub>2</sub>.

a. Comptage des cellules. Les cellules *Sf9* sont comptées en utilisant une cellule de Malassez. Une dilution des cultures en suspension n'est pas nécessaire pour le comptage.

b. Culture de cellules en monocouche. Les cellules maintenues en boîte sont "passées" (ou diluées) tous les 4-5 jours lorsqu'elles sont à confluence. Les cellules sont remises en suspension en redressant la boîte et la tapant assez fortement avec une main. Un traitement à la trypsine n'est pas nécessaire. Le milieu de culture contenant les cellules en suspension est alors dilué 5 à 10 fois dans du milieu de Grace complet, équilibré à température ambiante, pour ensemercer de nouvelles boîtes de culture.

c. Culture de cellules en suspension. Les cellules sont maintenues en suspension dans des erlens par agitation à 100 rotations/min. L'addition d'un surfactant (Pluronic F-68) est fortement conseillé pour éviter les dommages aux cellules par frottement et pour une meilleure oxygénation du milieu de culture. Les cellules sont maintenues entre des densités de

0,2 à  $4 \times 10^6$  cellules/ml par simple dilution dans du milieu de Grace complet. En routine, les cellules en suspension doivent être remplacées tous les 2 à 3 mois (environ 30 "passages" ou dilutions) par des cellules fraîchement décongelées.

d. Congélation/décongélation des cellules Sf9. Les cellules doivent être congelées en phase exponentielle de croissance (1 à  $2 \times 10^6$  cellules/ml). Les cellules sont centrifugées 10 min à 180 g et remises en suspension à une densité de  $10^7$  cellules/ml dans une solution contenant du sérum de veau fœtal 90 % [v/v] et du DMSO 10 % [v/v]. Les cellules sont aliquotées dans des tubes cryogéniques stériles. La congélation se fait en trois temps : 1 h à  $-20^\circ\text{C}$ , puis une nuit à  $-80^\circ\text{C}$ , les tubes sont alors transférés dans l'azote liquide pour conservation.

Pour décongeler les cellules d'insecte, le tube conservé dans l'azote liquide est directement placé dans un bain-marie à  $37^\circ\text{C}$ , en l'agitant doucement. Lorsque le contenu est pratiquement décongelé, l'extérieur du tube est décontaminé avec de l'éthanol et placé dans la glace. La suspension cellulaire est alors diluée 5 fois dans du milieu de Grace complet froid dans une boîte de culture de  $25 \text{ cm}^2$ . Après 1 h à  $27^\circ\text{C}$ , les cellules adhèrent à la surface de la boîte. Le milieu est éliminé et remplacé par du milieu frais (5 ml). Ce milieu est encore remplacé 24 h plus tard, puis les cellules sont "passées" (ou diluées) successivement dans des boîtes plus grandes lorsqu'elles sont à confluence. Une culture de cellules en suspension d'environ 50 ml peut être inoculée à partir d'une boîte de  $175 \text{ cm}^2$  de cellules confluentes.

### **3. Clonage de l'ADNc dans le vecteur de transfert**

Les séquences codant les protéines IE18, IE16-1, p16-2 d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenues à partir de digestions enzymatiques des plasmides pBlueScript(KS) dans lesquels ces inserts avaient été clonés (voir paragraphe V B1, p. 57). Le vecteur pBlueBacHis2-B (annexe 3) a été utilisé pour le clonage des séquences codantes de IE16-1, IE18 d'*Arabidopsis* et ORF229 de tabac, et le vecteur pBlueBacHis2-A (annexe 2) a été utilisé pour p16-2. Pour chaque construction, la séquence codant la protéine a été fusionnée à une région 3' permettant l'adjonction, à la protéine exprimée, d'une séquence N-terminale contenant une étiquette poly-histidine et un épitope Xpress (DLYDDDDK). Le critère de pureté de l'ADN étant essentiel pour la transfection, les plasmides recombinants ont été préparés avec le système "Midi-Preps" de Quiagen qui repose sur la purification de l'ADN sur une matrice d'affinité.

### **4. Transfert de l'ADNc dans le génome du baculovirus**

Le baculovirus utilisé est le virus à polyèdre nucléaire *Autographa californica* (AcMNPV). L'ADNc de la protéine recombinante est inséré dans le génome du baculovirus sauvage par double recombinaison homologue. En pratique, les cellules d'insecte en monocouche sont cotransfectées par un mélange d'ADN plasmidique et d'AcMNPV linéarisé en utilisant une solution de liposomes cationiques. Cette expérience implique les diverses étapes suivantes :

1.  $2 \times 10^6$  cellules en phase logarithmique de croissance sontensemencées sur une boîte de 60 mm dans du milieu de Grace complet pendant 30 min à 1 h.

2. On prépare le mélange de transfection suivant :

0,5  $\mu\text{g}$  d'ADN AcMNPV linéarisé (ADN Bac-N-Blue<sup>TM</sup>, Invitrogen)

4  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique (vecteur de transfert contenant le fragment de l'ADNc codant la protéine recombinante)

1 ml de milieu de Grace sans additifs ni sérum

20  $\mu\text{l}$  de solution de liposomes cationiques préalablement vortexée

L'ensemble est vortexé vigoureusement pendant 10 sec puis incubé à température ambiante pendant 15 min.

3. Pendant ce temps, le milieu de Grace complet des cellules est éliminé et remplacé par 2 ml de milieu de Grace sans additifs.

4. Après quelques min, le milieu sans additifs est éliminé, et le mélange de transfection (environ 1 ml) est ajouté goutte à goutte sur la monocouche de cellules. L'ensemble est incubé pendant 4 h sur une plate forme oscillante.

5. 1 ml de milieu de Grace complet est ajouté et les boîtes sont incubées à 27°C en atmosphère humide.

6. Après 72 h, le milieu de culture est récolté et stocké à 4°C. Ce milieu constitue le stock de virus à partir duquel le virus recombinant doit être purifié. A ce stade, les cellules ne montrent pas encore de signes d'infection (mais les virions ont été relargués dans le milieu). Il est donc nécessaire de poursuivre la culture des cellules pour confirmer le succès de la transfection. 3 ml de milieu de Grace complet sont ajoutés sur la monocouche de cellules et les boîtes sont incubées à 27°C.

7. Les cellules sont observées au microscope à phase inversée à partir de 4 à 5 jours après la transfection pour confirmer le succès de la cotransfection. Sous un agrandissement 250-400x, certaines cellules (infectées par le virus sauvage) doivent présenter des inclusions virales, les polyédrons, qui forment des cristaux réfractants dans le noyau des cellules. Les cellules doivent apparaître plus grosses et perdre leur adhérence.

## **5. Purification du virus recombinant**

Le milieu récolté à l'étape précédente peut contenir des virus sauvages provenant d'une recircularisation d'ADN viral sauvage partiellement digéré lors de sa préparation. Il est donc nécessaire d'effectuer une étape de purification des virus recombinants. La purification du virus recombinant se fait par infection (après dilution) d'une monocouche de cellules sous une couche d'agarose, évitant ainsi une diffusion du virus. La dilution du stock de virus permet d'isoler un clone unique recombinant. La purification du virus implique les étapes suivantes :

1. Des boîtes de 60 mm sontensemencées avec 2 à  $2,5 \times 10^6$  cellules dans 2 ml de milieu complet. La monocouche doit être régulière, à 50 % de confluence et les cellules bien adhérentes.
  2. Des dilutions ( $1/10^{\text{ème}}$ ) du stock viral sont préparées dans 1 ml de milieu de Grace complet : on prépare en général des dilutions en série de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ .
  3. Après 1 h d'incubation à  $27^{\circ}\text{C}$ , le milieu de Grace complet sur les monocouches est éliminé et remplacé par 1 ml de la dilution du stock de virus. L'infection se poursuit 1 h sur plateau oscillant, à température ambiante.
  4. Pendant ce temps, la couche d'agarose est préparée. Pour chaque boîte, il faut utiliser 2 ml d'agarose 2 % [p/v] (Invitrogen). L'agarose se prépare dans de l'eau et est stérilisé par autoclavage le jour de l'utilisation. Pour éviter la prise en masse de l'agarose, la solution est conservée dans un bain-marie à  $46^{\circ}\text{C}$ . Au terme de l'incubation, cette solution est mélangée à un volume équivalent de milieu de Grace complet à température ambiante.
  5. En travaillant rapidement, la dilution du stock de virus est éliminée, et le mélange agarose/milieu de Grace (4 ml) est coulé lentement sur les cellules en appuyant la pipette sur le bord de la boîte. Le mélange agarose/milieu ne doit pas être solidifié avant d'être coulé sur boîte, car il ne peut pas être refondu. Il faut ensuite laisser solidifier l'agarose à température ambiante.
  6. Lorsque l'agarose est solidifiée, 2 ml de milieu complet sont ajoutés sur la couche d'agarose et la boîte est incubée à  $27^{\circ}\text{C}$  en atmosphère humide.
  7. Le vecteur utilisé (pBlueBacHis2) contient le gène de la  $\beta$ -galactosidase qui a été inséré avec l'ADNc codant la protéine recombinante dans le génome du virus. Les cellules infectées par le virus recombinant expriment donc la  $\beta$ -galactosidase et peuvent être sélectionnées par une réaction colorimétrique utilisant le substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal) selon le protocole suivant : 3 jours après infection, une solution de X-gal (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dans du DMF) est ajouté au milieu de Grace. 2 à 4 jours après, l'apparition des plages de lyses bleues est observée au microscope.
  8. Plusieurs plages de lyse positives sont localisées au dos de chaque boîte, puis prélevées avec une pipette stérile de 1 ml et placées dans 1 ml de milieu de Grace complet en rinçant plusieurs fois la pipette. Il faut ensuite vortexer pour relarguer les particules virales du bouchon d'agarose.
  9. Cette suspension virale est ensuite utilisée pour produire un stock de virus recombinant P-1 et pour une analyse de l'ADN viral par PCR (voir ci-dessous).
- Une boîte contenant 12 puits estensemencée avec  $5 \times 10^5$  cellules en phase logarithmique de croissance. Du milieu de Grace (1 ml) est ajouté à chaque puits. Le milieu de Grace (1 ml)

contenant une plage de lyse recombinante est utilisé pour infecter 10 puits. Les 2 puits restants contiennent des cellules infectées par le virus sauvage ou des cellules non infectées (contrôles). La boîte est incubée à 27°C pendant 3 jours en atmosphère humide.

**10.** Lorsque les corps d'inclusion apparaissent dans les cellules infectées par le virus sauvage, le milieu de chaque puits est pipeté plusieurs fois afin de décoller les cellules. Une aliquote (750 µl) de chaque suspension est prélevée pour la purification de l'ADN viral et l'analyse par PCR. Le reste de la suspension est à nouveau incubé à 27°C jusqu'à lyse totale des cellules (5 à 7 jours). A ce stade, les milieux de chaque puits sont prélevés et stockés à 4°C. Ils constituent les stocks de virus purifiés P-1.

**11.** Afin d'isoler l'ADN viral, les 750 µl de suspension prélevés sont centrifugés 3 min à 5 000 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et mélangé à 750 µl de PEG 20 % [v/v] dans du NaCl 1 M froid. L'ensemble est homogénéisé en inversant le tube plusieurs fois, puis incubé à température ambiante pendant 30 min. Une centrifugation de 10 min à 14 000 g permet de concentrer les particules virales. Le culot est repris dans 100 µl d'eau stérile, puis traité à la protéinase K (10 mg/ml) pendant 1 h à 50°C. Les protéines sont éliminées au cours d'une extraction par un volume de phénol/chloroforme (1/1) [v/v]. Après une centrifugation de 5 min à 14 000 g, l'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par addition d'un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol. L'ensemble est incubé 30 min à -20°C, puis centrifugé 15 min à 14 000 g à 4°C. Le culot est lavé avec 300 µl d'éthanol 70 % [v/v] puis l'ADN est solubilisé dans de l'eau stérile. La présence de l'ADN codant pour la protéine recombinante est déterminée par une analyse par PCR en utilisant des amorces complémentaires aux séquences présentes sur l'ADN viral de part et d'autre du site d'insertion de l'ADN codant la protéine à exprimer.

## **6. Amplification des stocks de virus**

Les stocks de virus correspondent aux surnageants de cultures de cellules infectées dont la lyse cellulaire est supérieure à 90 %. Ces surnageants peuvent être stockés à 4°C pendant plus de 2 ans sans changement du titre du virus. Les cycles de congélation/décongélation qui font rapidement chuter le titre du stock sont déconseillés. Il est toutefois recommandé de stocker des aliquotes de virus recombinants à -80°C.

**a. Première amplification.** 2 boîtes de 25 cm<sup>2</sup> sontensemencées avec 2x10<sup>6</sup> cellules en phase logarithmique de croissance dans 5 ml de milieu de Grace complet. Après ajout de 20 µl du stock viral P-1, chaque boîte est incubée à 27°C pendant 5 à 10 jours jusqu'à ce que 80 à 90 % des cellules soient lysées. La totalité du milieu est alors prélevée, transférée dans un tube stérile puis centrifugée pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant constitue le stock viral P-2.



**b. Préparation d'un stock de virus à haut titre.** Une aliquote (5 ml) du stock viral P-2 est ajoutée à 500 ml d'une suspension cellulaire à  $1,8$  à  $2,2 \times 10^6$  cellules/ml. Cette suspension est incubée à  $27^\circ\text{C}$  pendant 7 à 10 jours. Le milieu de culture est récolté quand la lyse des cellules est supérieure à 90 %, puis centrifugé 20 min à 1 000 g ou décanté pendant la nuit. Le surnageant est transféré dans un tube stérile, il correspond au stock viral P-3 à haut titre.

**c. Détermination du titre du virus (Sussman, 1995).** Pour obtenir une infection synchrone, ou pour infecter les cellules à un taux particulier de particules virales/cellule (appelé MOI = Multiplicity of Infection), il est nécessaire de connaître le titre du stock de virus. Une boîte 48 puits estensemencée avec  $5 \times 10^4$  cellules dans 500  $\mu\text{l}$  de milieu de Grace complet par puits. Les cellules sont infectées par addition de 100  $\mu\text{l}$  d'une dilution virale ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  dans du milieu de Grace complet). La boîte est incubée 20 h à  $27^\circ\text{C}$ . Le milieu est éliminé et 500  $\mu\text{l}$  de glutaraldéhyde 0,5 % [v/v] (dans du PBS) sont ajoutés à chaque puits. Après 10 min à température ambiante, les cellules sont lavées 3 fois dans 500  $\mu\text{l}$  de PBS pendant 3 min. 500  $\mu\text{l}$  de solution de coloration (ferricyanure de potassium 5 mM, ferrocyanure de potassium 5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM, X-gal 1 mg/ml dans DMF, dans du PBS) préparée extemporanément sont ajoutés. Après 3 h à  $27^\circ\text{C}$ , les cellules sont lavées 2 fois dans du tampon PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM) et conservées dans ce même tampon. Les cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase sont comptées dans les puits qui contiennent au total une centaine de cellules positives. Le titre est donné par la relation suivante :

$$\text{Titre (pfu/ml)} = \text{nombre de cellules positives} \times \text{dilution} \times 10$$

## 7. Production de protéines recombinantes

En général, la surexpression de protéines recombinantes est maximale pour un MOI de 5 après 60-72 h d'infection. En revanche, pour des raisons de toxicité de la protéine recombinante, il est parfois utile de confirmer ces optima par une analyse par électrophorèse et immunomarquage.

**a. Optimisation de l'expression de protéines recombinantes.** 3 boîtes contenant chacune 6 puits sontensemencées avec  $2 \times 10^6$  cellules par puits. Dans chaque puits sont ajoutés 2 ml de milieu de Grace complet et différentes quantités du stock viral P-3 (0, 10, 20, 50, 100 et 500  $\mu\text{l}$ ). Les boîtes sont ensuite incubées à  $27^\circ\text{C}$  pendant 48, 65 et 72 h (un temps/boîte). Aux différents temps choisis, les cellules sont remises en suspension, transférées dans un tube Eppendorf, centrifugées 10 min à 800 g et lavées deux fois dans du tampon PBS froid. Le culot de cellules est repris dans du tampon A (Tris/HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, glycérol 10 % [v/v], DTT 1 mM, PMSF 2 mM, acide  $\epsilon$ -aminocaproïque 0,5 mM, benzamidine/HCl 1 mM) pour obtenir une concentration de  $10^7$  cellules/ml.

Les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation (dans l'azote liquide)/décongélation, puis par sonication 30 sec et aspiration avec une seringue de 19 G (afin de casser l'ADN). Cet

extrait brut est ensuite centrifugé à 100 000 g pendant 1 h à 4°C, le culot obtenu contient les membranes et les microsomes. Cette fraction membranaire est resuspendue dans le tampon B (Tris/HCl 2 mM pH 7,5, DTT 1 mM, PMSF 2 mM, glycérol 10 % [v/v]). Les différentes fractions obtenues sont ensuite analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes et par immunodétection afin de déterminer la quantité de virus (MOI) et le temps d'infection entraînant la production maximale de protéine recombinante.

**b. Production en masse de protéines recombinantes.** L'infection est réalisée sur des cultures de cellules en suspension à forte densité ( $2$  à  $3 \times 10^6$  cellules/ml). Après 1 à 2 h, la suspension est diluée pour obtenir une densité de  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml. Le volume du stock viral ajouté est fonction du MOI choisi pour l'infection. Au temps optimal déterminé pour l'expression, la suspension de cellules est collectée, centrifugée 10 min à 180 g. Le culot de cellules est lavé dans du tampon PBS puis centrifugé 10 min à 180 g. Les cellules sont remises en suspension dans un tampon contenant Tris/HCl 20 mM (pH 7,5), PMSF 2 mM, glycérol 10 % [v/v], congelées et décongelées plusieurs fois et soniquées afin de casser la totalité des cellules. Cette suspension est ensuite centrifugée 1 h à 100 000 g afin de distinguer une fraction membranaire et une fraction soluble.

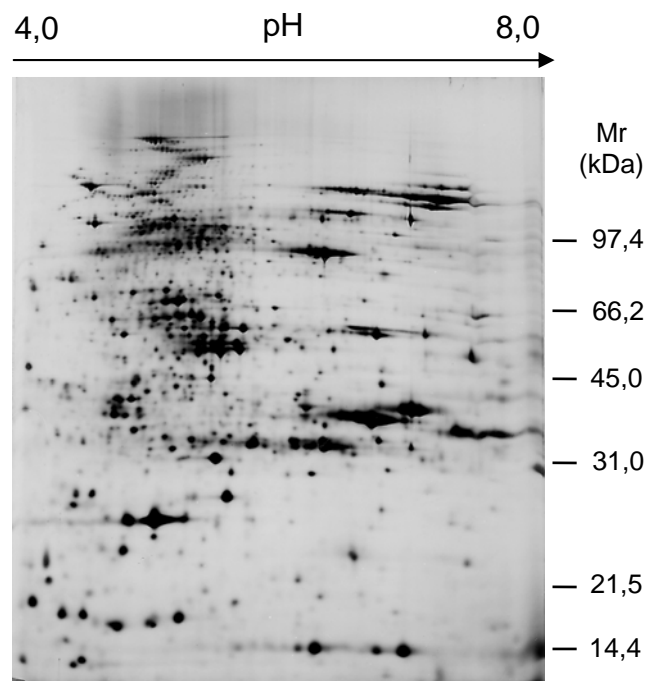
# CHAPITRE I

## UNE APPROCHE PROTEOMIQUE SUBCELLULAIRE SPECIFIQUE POUR IDENTIFIER DES PROTEINES HYDROPHOBES RARES

L'extraction et la séparation des protéines, combinées au séquençage représentent un outil de choix pour l'identification de nouvelles protéines. L'électrophorèse bidimensionnelle est généralement utilisée car elle permet une meilleure séparation des polypeptides, qui sont ainsi identifiables plus facilement. Elle repose sur la séparation des protéines selon deux caractéristiques qui leur sont propres : leur point isoélectrique et leur masse moléculaire. Cette technique a fait des progrès considérables au cours des dernières années. Ainsi, les problèmes liés à l'instabilité des gradients de pH au cours du temps, la non reproductibilité des séparations, et la faible capacité des gradients d'Ampholytes ont été *a priori* résolus par l'utilisation de gradients de pH immobilisés. Ceux-ci présentent deux avantages majeurs : d'une part, ils permettent d'obtenir une grande reproductibilité des séparations et d'autre part, ils possèdent une très forte capacité compatible avec la réalisation de gels préparatifs où plusieurs milligrammes de protéines peuvent être déposés en vue d'analyses structurales (Rabilloud *et al.*, 1995 ; Sanchez *et al.*, 1999 ; Vocanson *et al.*, 1994). Ces critères nous avaient semblé déterminants dans le choix de cette méthode d'électrofocalisation en gradients de pH immobilisés pour l'analyse des protéines de l'enveloppe. Ainsi, la figure 9 montre un profil protéique obtenu après séparation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines de l'enveloppe. Apparemment, une telle séparation semble tout à fait satisfaisante, elle est très résolutive et reproductible. Elle révèle aussi la très grande complexité de la composition protéique de l'enveloppe des chloroplastes. Cependant, si on analyse plus précisément les polypeptides présents sur ce gel, on s'aperçoit très rapidement que certaines protéines caractéristiques sont absentes. C'est en particulier le cas du transporteur de phosphate/triose phosphate, protéine majeure de l'enveloppe. En fait, ce résultat n'est pas très surprenant dans la mesure où cette protéine présente un point isoélectrique alcalin, en dehors de la gamme de pH utilisée dans la première dimension (pH 4,0 à 8,0). D'autres transporteurs de métabolites localisés dans la membrane interne ne peuvent donc pas être analysés, tels que le transporteur de 2-oxoglutarate/malate (pI = 9,6 ; Weber *et al.*, 1995) ou le transporteur de phosphoénolpyruvate (pI = 10,3 ; Fischer *et al.*, 1997). Par ailleurs, le microséquençage systématique des protéines de l'enveloppe des chloroplastes séparées sur un gel 2D semi-préparatif a montré qu'en fait seules des protéines solubles, contaminantes pour la plupart, pouvaient être identifiées dans un tel gel : fragments de la grande sous-unité de la Rubisco,

protéine ribosomale L12 du chloroplaste, etc... (Adessi *et al.*, 1997 ; Miège, 1998). De fait, la majorité des protéines séparées lors d'une analyse par électrophorèse 2D ne sont pas hydrophobes, ces dernières ne pénétrant pas dans le gel. En effet, les protéines et la matrice de première dimension interagissent entre elles au voisinage du point isoélectrique, où les protéines hydrophobes précipitent et ne sont donc pas transférées dans le gel de deuxième dimension. Ainsi, malgré les beaux profils des gels 2D (figure 9), l'électrofocalisation des protéines membranaires se traduit par des pertes massives de protéines hydrophobes. D'autres équipes sont arrivées aux mêmes conclusions (Garrels *et al.*, 1997 ; Wilkins *et al.*, 1998b). Or les transporteurs correspondent à des protéines très hydrophobes. Un tel problème n'est pas spécifique de l'enveloppe des chloroplastes. En effet, on retrouve la même limite dans une étude systématique des protéines de la membrane plasmique d'*Arabidopsis* (Santoni *et al.*, 1998).

**Figure 9. Séparation des protéines de l'enveloppe par électrophorèse bidimensionnelle.** 200 µg de protéines d'enveloppe solubilisées dans le CHAPS (4 %, [m/v]), le Triton-X 100 (0,4 %, [v/v]) et 5 M urée, sont électrofocalisés dans une première dimension (sur gradient de pH immobilisé, Immobilines, pH 4-8), puis les protéines sont séparées dans une deuxième dimension par SDS-PAGE, et enfin colorées au nitrate d'argent (Joyard *et al.* 1998).



Nous avons donc cherché à développer une autre approche permettant d'analyser spécifiquement les protéines hydrophobes de l'enveloppe des chloroplastes. Les critères qui ont guidé le choix d'une nouvelle stratégie sont les suivants :

- **Une localisation subcellulaire spécifique : l'enveloppe des chloroplastes.** Le matériel biologique que nous utilisons est donc de l'enveloppe isolée de chloroplastes d'épinard, dans le meilleur état de pureté possible.
- **La sélection des protéines les plus hydrophobes de l'enveloppe.** Les transporteurs possèdent tous des domaines transmembranaires très hydrophobes qui leur confèrent des propriétés particulières de solubilité dans certains solvants organiques.
- **L'enrichissement des protéines hydrophobes rares.** L'enveloppe renferme de très nombreuses protéines et très peu représentent plus de 1 % des protéines totales du

chloroplaste. La diversité des fonctions de l'enveloppe suggère que de très nombreuses protéines hydrophobes ne seront présentes qu'en très petite quantité dans les divers extraits. L'utilisation de solvants organiques devrait permettre de concentrer ces protéines dans de petits volumes et ainsi de les analyser.

## **I. EXTRACTION DES PROTEINES HYDROPHOBES DE L'ENVELOPPE DANS DES MELANGES CHLOROFORME/METHANOL**

Initialement, la solubilisation des protéines dans les mélanges chloroforme/méthanol a permis de caractériser les protéolipides, protéines très hydrophobes souvent retrouvées dans les membranes (Folch & Lees, 1951). En fait, ces mélanges renferment une assez grande diversité de protéines. Dans le cas de l'enveloppe, l'extraction des protéines à l'aide de mélanges chloroforme/méthanol a eu pour objectif de simplifier les profils protéiques très complexes dans un but d'inventaire de l'équipement polypeptidique de ce système membranaire (Joyard *et al.*, 1982, 1983). Nous avons donc cherché à définir un protocole d'extraction permettant l'analyse systématique des protéines hydrophobes, même mineures, de l'enveloppe des chloroplastes. Cette méthode devait aussi être compatible avec les techniques de microséquençage et devait ainsi conduire à l'identification de nouvelles protéines.

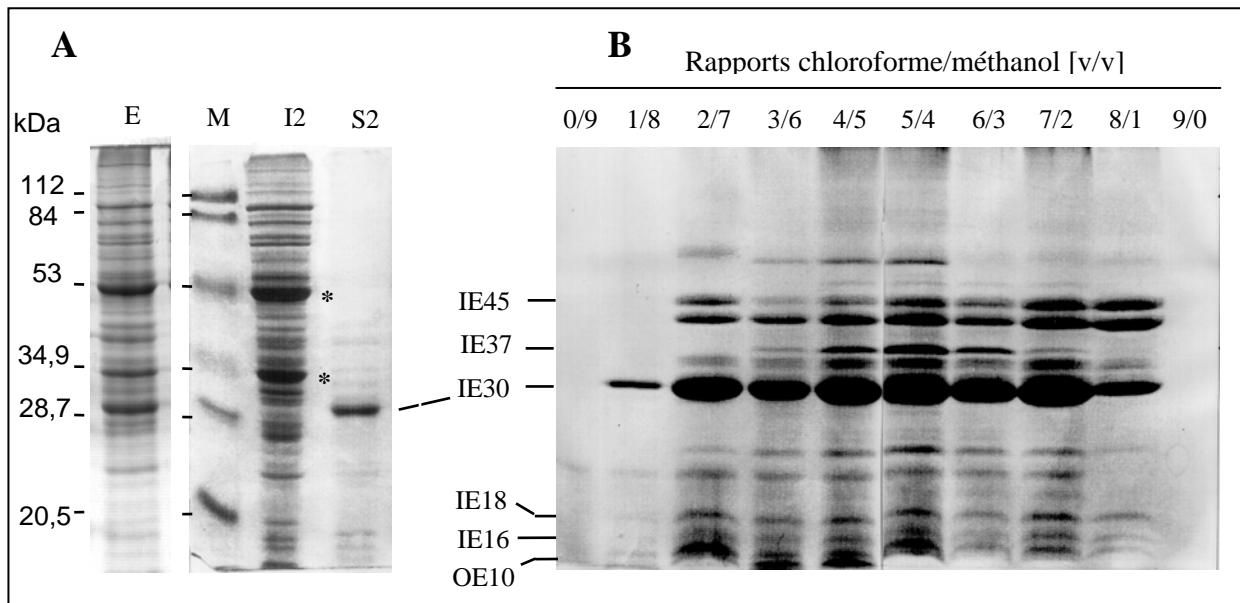
### **A. Protocole d'extraction des protéines hydrophobes dans les solvants organiques**

L'enveloppe (concentration 5 à 6 mg de protéines par ml) est répartie dans 10 tubes Eppendorf (100 µl par tube). Les membranes sont ensuite incubées 30 min avec 900 µl de différents mélanges chloroforme/méthanol (C/M) [v/v], dans la glace. La répartition des volumes de chloroforme et de méthanol varie de 0/9 (0 volume de chloroforme et 9 volumes de méthanol) à 9/0 [v/v]. L'ensemble est centrifugé à 14 000 g pendant 15 min à 4°C. Les tubes contenant les mélanges C/M dans des rapports 6/3, 7/2, 8/1, 9/0 [v/v] présentent deux phases. Les protéines solubles dans la phase organique sont localisées dans la phase supérieure et les protéines insolubles précipitent à l'interface. Pour les autres rapports, le culot contient les protéines insolubles dans le chloroforme/méthanol et la phase organique (le surnageant) contient les protéines solubles. Après évaporation de la phase organique sous azote pour obtenir un volume final d'environ 200 µl, les protéines solubles et insolubles (pour des mélanges C/M dans des rapports 6/3, 7/2, 8/1, 9/0 [v/v]) sont précipitées par ajout d'acétone 80 % [v/v] froid, et centrifugées à 14 000 g pendant 15 min à 4°C. Les différents culots sont solubilisés dans du tampon de dépôt 1X (voir composition dans le paragraphe II D1, p 45) contenant du SDS 4 % [v/v] et analysés par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes.

### **B. Analyse des protéines extraites dans des mélanges de solvants organiques**

La figure 10A montre que des protéines de l'enveloppe du chloroplaste peuvent être extraites

à l'aide de solvants organiques. Ces extractions libèrent une majorité de protéines hydrophiles (puits I2 et I4, protéines insolubles dans la phase organique) et une faible proportion de protéines hydrophobes, solubles dans les solvants (puits S2 et S4). Les protéines hydrophobes, solubles dans les solvants, représentent environ 5 à 10 % des protéines d'enveloppe du chloroplaste. Sachant que les protéines de l'enveloppe représentent 1 % des protéines du chloroplaste (i.e. 0,4 % des protéines cellulaires totales), les protéines hydrophobes extraites dans les mélanges chloroforme/méthanol représentent environ 0,1 % des protéines du chloroplaste et 0,04 % des protéines cellulaires totales.



**Figure 10. Extraction des protéines hydrophobes de l'enveloppe du chloroplaste par des mélanges de chloroforme/méthanol.**

**A.** Les protéines solubles dans le chloroforme/méthanol représentent une faible proportion des protéines totales de l'enveloppe du chloroplaste. Après extraction dans un mélange chloroforme/méthanol 6/3 [v/v], les protéines solubles et insolubles sont solubilisées dans le même volume de tampon de dépôt (voir "matériel et méthodes générales") et le même volume de chaque fraction est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes. Le puits noté I correspond aux protéines insolubles dans la phase organique. Dans cette fraction, les protéines majeures sont IE37 (indiquée par l'étoile du bas) et la grande sous-unité de la Rubisco (indiquée par l'étoile du haut). Le puits S correspond aux protéines solubles dans la phase organique. Dans cette fraction, la protéine majeure correspond au transporteur de phosphate/triose phosphate (IE30). Les quantités de protéines déposées sur le gel correspondent à 50 µg (I2 + S2). E : protéines totales de l'enveloppe, 25 µg.

**B.** Extractions différentielles des protéines hydrophobes de l'enveloppe dans des mélanges chloroforme/méthanol variant de 0/9 à 9/0 [v/v]. La composition des extraits est analysée par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les extractions ont été effectuées à partir de quantités d'enveloppe 10 fois supérieures à celles utilisées pour la figure 9A puits I2. Le transporteur de phosphate/triose phosphate (IE30) est présent dans la plupart des fractions. La protéine IE37, moins hydrophobe, est retrouvée principalement dans les fractions 4/5 à 6/3 [v/v].

Le profil protéique d'un extrait chloroforme/méthanol contient environ 15 à 20 bandes colorées au Bleu de Coomassie (figure 10A). Dans cette fraction, le polypeptide majeur (environ 30 kDa) correspond à la protéine majeure de la membrane interne du chloroplaste, le

transporteur de phosphate/triose phosphate (Flügge *et al.*, 1989). Cette protéine qui représente environ 10 à 20 % des préparations de membranes d'enveloppe, représente plus de 50 % du contenu protéique des extraits chloroforme/méthanol. Au contraire, la fraction contenant les protéines insolubles dans les solvants contient une grande variété de protéines : des protéines intrinsèques de l'enveloppe ayant une faible hydrophobicité (comme IE37 et OE24) et des protéines extrinsèques dont des contaminants du stroma comme la grande sous-unité de la Rubisco (figure 10A).

Nous avons ensuite cherché à déterminer les conditions d'extraction des protéines hydrophobes dans les solvants organiques permettant de conjuguer pureté et rendement.

### **C. Optimisation de la technique d'extraction des protéines hydrophobes**

Les limitations à l'obtention de quantités importantes et reproductibles de protéines hydrophobes résident dans la faible quantité de protéines obtenues, leur contamination par des lipides et les problèmes de migration sur gel d'acrylamide, même en conditions dénaturantes. Ces problèmes ont été résolus en suivant lors de chaque nouvelle extraction, rendement et qualité des préparations. Les paramètres étudiés ont été les suivants :

- Influence des rapports protéines/solvants (rendement de l'extraction).
- Influence de la technique de concentration des protéines : les protéines sont généralement précipitées au TCA en présence de détergent, cependant ce type de précipitation concentre aussi les lipides et les pigments. Les lipides et les pigments peuvent être extraits partiellement par rinçage du culot avec de l'éther froid. Mais cela entraîne des problèmes de solubilisation des protéines, de migration et cette méthode limite les étapes suivantes de digestion et de microséquençage des protéines. Nous avons utilisé une autre technique qui consiste à concentrer les protéines par précipitation à l'acétone 80 %. Cette étape de concentration permet aussi d'éliminer les pigments et les lipides.
- Influence des techniques de re-solubilisation des protéines en présence de détergents.

Cette étape de mise au point de la technique d'extraction a imposé de préparer plusieurs dizaines de mg de protéines d'enveloppe.

### **D. Détermination des conditions de sélection des protéines les plus hydrophobes**

Les protéines intrinsèques contiennent des proportions variables de domaines hydrophobes, ce qui donne un caractère plus ou moins hydrophobe à la protéine. Nous avons donc cherché à déterminer si une solubilisation différentielle des protéines hydrophobes de l'enveloppe pouvait être obtenue en faisant varier les rapports de chloroforme/méthanol. Le but de ce traitement est d'extraire spécifiquement et de concentrer les protéines hydrophobes de l'enveloppe (et plus particulièrement les protéines mineures). La figure 10B montre que les profils protéiques varient selon les rapports de chloroforme/méthanol.

Certaines protéines sont extraites dans toutes les conditions alors que d'autres ne sont présentes que pour des rapports de chloroforme/méthanol proches de 1. Par exemple, IE37 et les protéines de masse supérieure à 60 kDa sont surtout extraites pour des rapports chloroforme/méthanol de 4/5 à 6/3 [v/v] alors que IE30 (le transporteur de phosphate/triose phosphate) est présent dans la plupart des fractions. Cette protéine qui contient au moins 6 hélices transmembranaires (Flügge *et al.*, 1989) est très hydrophobe (voir figure 12C). Elle est extraite dans toutes les conditions utilisées, ainsi que dans des solutions de chloroforme ne contenant qu'un pour-cent de méthanol. En revanche, cette protéine n'est pas présente dans des solutions contenant du chloroforme ou du méthanol purs (figure 10B).

## **II. CARACTERISATION DES PROTEINES HYDROPHOBES EXTRAITES DANS DES MELANGES DE CHLOROFORME/METHANOL**

Deux stratégies complémentaires ont été utilisées pour tenter de caractériser les protéines extraites de l'enveloppe par les solvants organiques. Tout d'abord, nous avons préparé des anticorps polyclonaux contre l'ensemble des protéines extraites afin de cribler une banque d'expression d'épinard dans  $\lambda$ gt11. Dans une seconde étape, nous avons entrepris l'analyse systématique des protéines ainsi extraites par microséquençage.

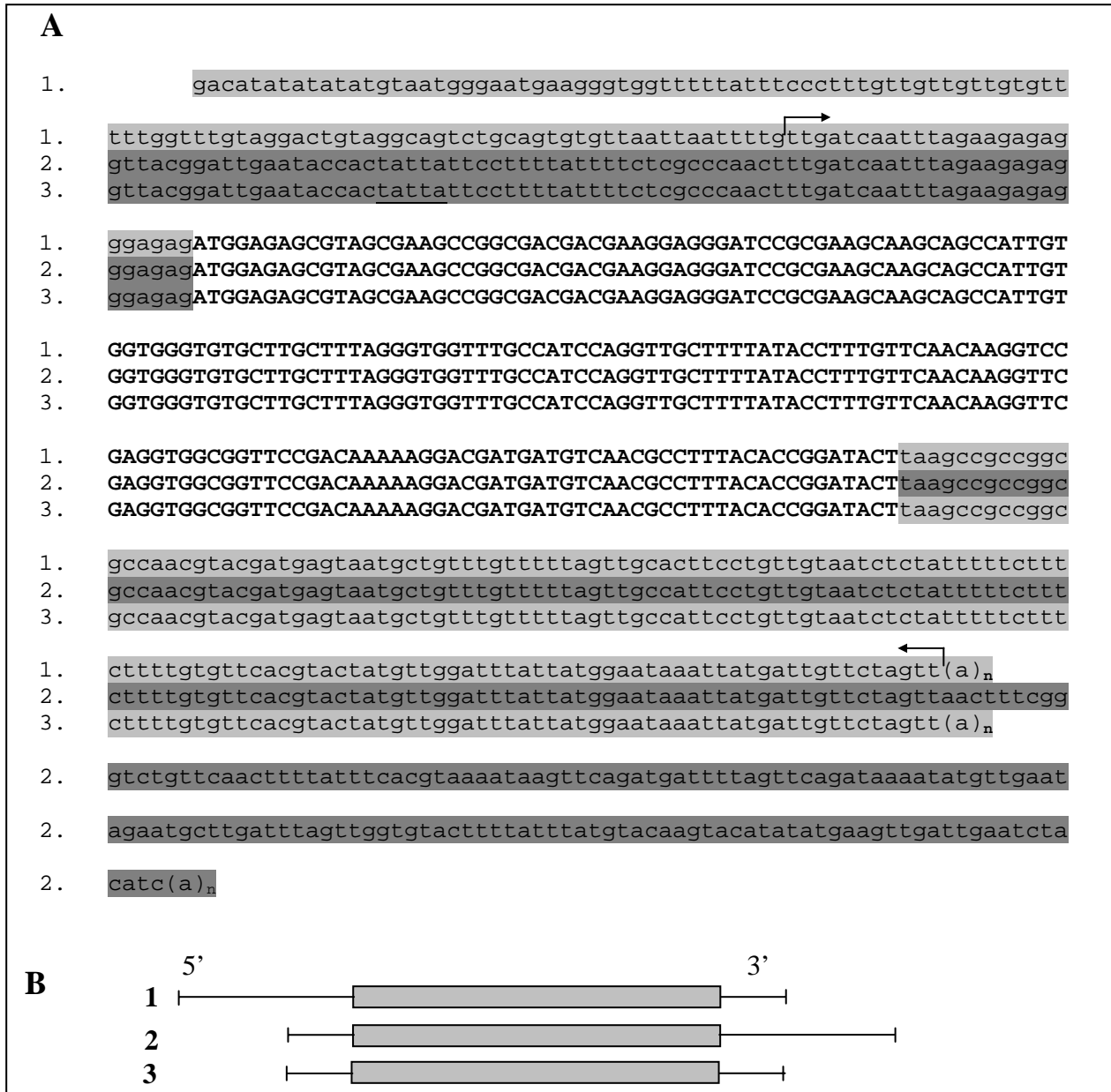
### **A. Criblage d'une banque d'expression à l'aide d'anticorps polyclonaux**

Le sérum utilisé pour cribler la banque contient des anticorps dirigés contre l'ensemble des protéines extraites dans le mélange chloroforme/méthanol 6/3 [v/v].

Nous avons criblé 300 000 clones et obtenu 47 clones positifs. Tous ces clones contenaient un ADNc codant pour une seule et même protéine de la membrane externe de l'enveloppe, déjà décrite, la protéine OE10 (Salomon *et al.*, 1990). La figure 11 montre les 3 séquences d'ADNc obtenues lors de ce criblage. Ces ADNc se différencient au niveau des séquences non codantes 5' et 3'. Salomon *et al.* (1990) avaient déjà identifié deux d'entre eux (ADNc 1 et 2, figure 11), nous en avons identifié un troisième qui est une combinaison des deux premiers. Aucune explication n'a été trouvée pour expliquer une telle représentation de l'ADNc codant cette protéine dans la banque, d'autant que OE10 est une protéine mineure de l'enveloppe (Joyard *et al.*, 1983). Cette protéine est très hydrophobe (figure 12F), elle contient un domaine transmembranaire qui représente la majeure partie de la protéine.

La représentation dans la banque d'expression des clones codant les protéines reconnues par le sérum semble être une limite cruciale pour ce type d'approche. Cependant, le résultat de ce criblage nous a permis de valider notre approche. En effet, les extraits de protéines purifiées dans les mélanges chloroforme/méthanol (a) contiennent bien des protéines très hydrophobes de l'enveloppe du chloroplaste et (b) ne semblent pas être contaminés par des contaminants hydrophiles, très antigéniques.





**Figure 11. Alignements des différentes séquences nucléotidiques codant pour la protéine OE10.** Les 3 ADNc obtenus sont indiqués par les numéros 1 à 3. La région codante commune aux 3 ADNc est indiquée par les lettres majuscules. Pour chacune des extrémités 5' et 3', 2 séquences différentes sont présentes. Les flèches indiquent le début et la fin de la région identique entre les 3 séquences. Le schéma (B) représente les 3 ADNc qui diffèrent par leurs extrémités 5' et 3'. Les rectangles gris correspondent à la séquence codante. Seuls les ADNc 1 et 2 étaient jusqu'alors décrits dans la littérature (Salomon *et al.*, 1990).

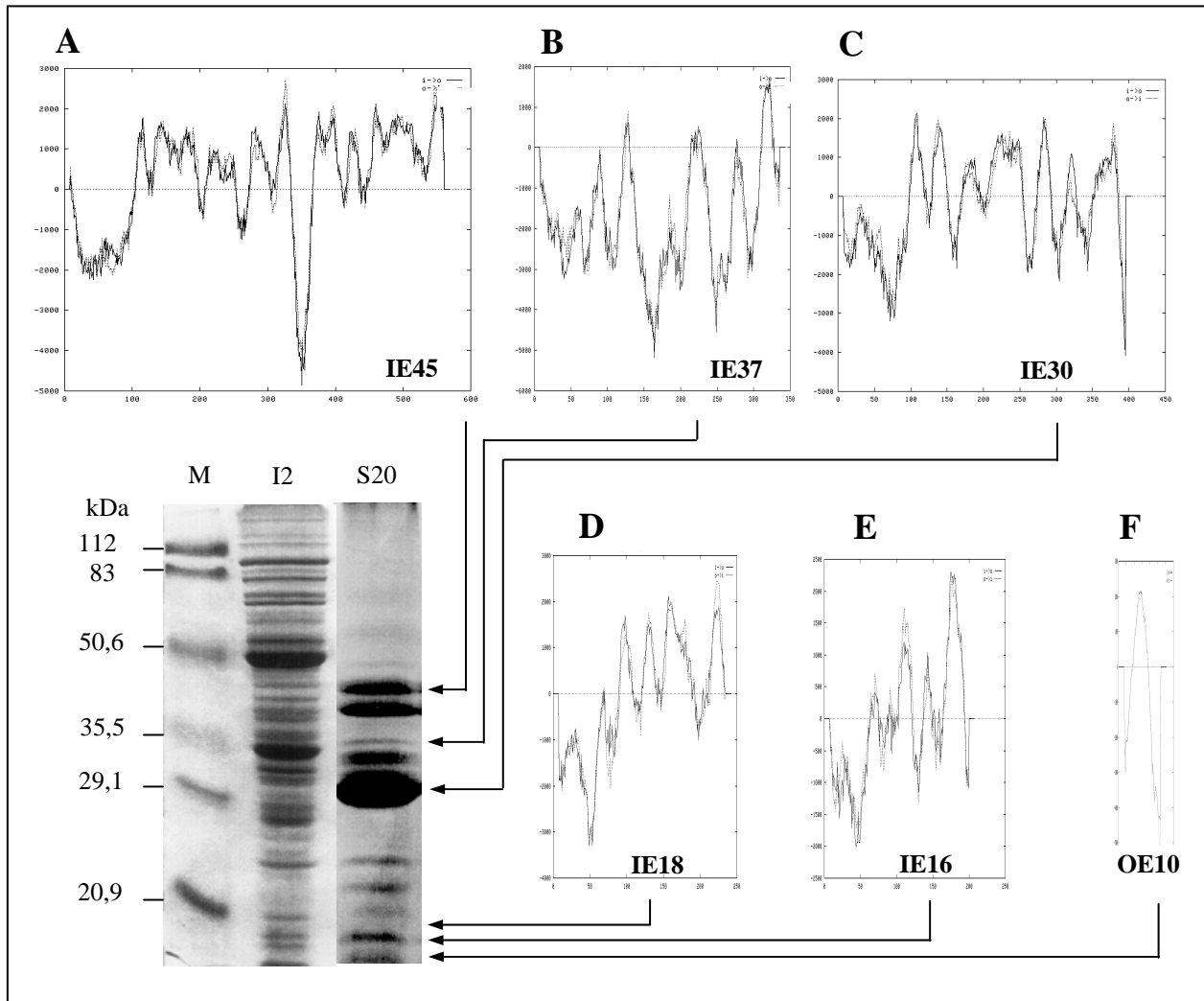
## B. Analyse par microséquençage des protéines de l'enveloppe solubles dans le chloroforme/méthanol

Nous avons cherché à déterminer la séquence *N*-terminale et/ou des séquences internes pour chacun des polypeptides séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Pour effectuer le séquençage *N*-terminal, les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. Dans le cas de la recherche de séquences internes, les protéines ont été digérées directement dans le

gel par diverses protéases. Des peptides ont ensuite été purifiés par HPLC et séquencés (voir matériel et méthodes). Le séquençage des protéines a représenté une étape critique dans cette approche, notamment à cause de l'hydrophobicité des peptides obtenus. Ces analyses ont été effectuées dans le Laboratoire de Chimie des Protéines (DBMS/CEA-Grenoble). Ce travail étant une étude systématique, toutes les protéines de l'enveloppe extraites par des mélanges de chloroforme/méthanol n'ont pas encore été analysées. Le tableau VII présente les séquences déjà obtenues. Elles correspondent à trois protéines de l'enveloppe déjà caractérisées, ainsi qu'à de nouvelles protéines non-identifiées de diverses masses moléculaires.

Protéine	Séquences obtenues
IE16	1. SATTPATDRLISSISYFLPF * 2. (K/R)TPY(L/I)P(L/I)VADA
IE 18	1. (K/R)SASLAASIAFER 2. DKATPSPSLSDVLWPSLGAFAGMAMLGKV(D) 3. (K/R)---PPAAS(L/I)P(L/I)(L/I)F(L/I)QNK
p25	1. ASSPASTGYGSPVDE *
IE30	1. VAP(L/I)THAVGNV(L/I)K 2. (I/L)STQTA(I/L)GTS(I/L)A(I/L)AGVA(L/I)YS(L/I)(I/L)K 3. F(I/L)SD(L/I)FWVGMFYH(L/I)YNQ(L/I)ATNT(L/I)ER
p35	1. (K/R)VSDSVPAP(D/S)(D/S)DAEQLRSA
IE37	1. (K/R)NVTILDQSPHQLAK
IE 41	1. (K/R)XEAATLNPIDRK
IE45	1. (K/R)AGG(I/L)F(L/I)P(L/I)VK 2. (K/R)A(I/L)GWMDWAK 3. (K/R)YG(L/I)(I/L)TWFSENVVK 4. (K/R)S(L/I)XXACGSNVGDGTER
p60 = dimère IE30	1. (K/R)VAP(L/I)THAVGNV(L/I)K 2. (K/R)HGFNDA(L/I)AK

**Tableau VII. Peptides obtenus après microséquençage N-terminal et interne de quelques protéines de l'enveloppe extraites dans les solvants organiques.** Les protéines extraites dans le chloroforme/méthanol sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les fragments de gel sont ensuite découpés et traités avec différentes protéases pour le séquençage interne. Pour le séquençage N-terminal (séquences indiquées par une étoile), les protéines sont transférées sur membrane PVDF. Les boîtes gris clair indiquent les résidus putatifs déduits de la spécificité de l'endoprotéase utilisée. Les boîtes noires indiquent les deux résidus possibles (I ou L) qui ont la même masse et ne peuvent donc pas être distingués l'un de l'autre lors d'un séquençage massique. Les tirets correspondent aux acides aminés n'ayant pas été déterminés.



**Figure 12. Profils d'hydrophobicité de quelques protéines membranaires de l'enveloppe extraites dans des mélanges chloroforme/méthanol.** Les protéines insolubles (I2) et les protéines solubles (S20) dans la phase organique sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les profils d'hydrophobicité des protéines identifiées dans la phase organique sont présentés. Les prédictions d'hydrophobicité ont été effectuées en combinant plusieurs "matrices de poids" (Hofmann & Stoffel, 1993).

### 1. Protéines déjà caractérisées

Les trois protéines déjà caractérisées sont IE30, IE37 et IE45 (tableau VII). IE37 est une protéine de 37 kDa localisée dans la membrane interne de l'enveloppe (Block *et al.*, 1983ab). C'est une protéine majeure de l'enveloppe qui est une méthyltransférase dépendante de la S- adénylméthionine (Teyssier *et al.*, 1996). Comme le montre la figure 12B, IE37 présente une hydrophobicité modérée et contient probablement seulement un domaine transmembranaire localisé en C-terminal. IE37 est un composant majeur de la fraction de protéines insolubles dans les solvants. Sa présence dans des extraits de chloroforme/méthanol était donc inattendue. Ces résultats montrent que des mélanges de chloroforme/méthanol de rapports 4/5 à 6/3 [v/v] peuvent aussi solubiliser des protéines d'hydrophobicité moyenne.

La seconde protéine déjà identifiée est le transporteur de 2-oxoglutarate/malate (IE45, Weber *et al.*, 1995), qui est un composant de la bande détectée à 45 kDa par coloration au bleu de Coomassie (figure 10B). Cette protéine de l'enveloppe est très hydrophobe, elle contient 12 hélices transmembranaires putatives (figure 12A).

Plusieurs séquences internes du transporteur de phosphate/triose phosphate (IE30) ont été obtenues, notamment dans une bande détectée à 60 kDa par coloration au bleu de Coomassie. Ces séquences proviennent d'une dimérisation du transporteur. Ce transporteur est aussi une protéine très hydrophobe (figure 12C) qui contient 6 hélices transmembranaires. La caractérisation d'un dimère de IE30 est très intéressante. En effet, le transporteur de phosphate/triose phosphate est, *in vivo*, une protéine dimérique (Flügge, 1985). Nos résultats suggèrent donc que ce dimère est particulièrement résistant à la solubilisation par le SDS. Cette observation est en accord avec ce que nous connaissons des propriétés physico-chimiques de ce transporteur. En effet, il est particulièrement difficile à solubiliser par des détergents. D'autre part, la formation de dimères semble être une propriété assez générale de certains transporteurs potentiels présents dans l'enveloppe, comme nous l'avons observé lors des essais de surexpression de certaines protéines dans des systèmes baculovirus/cellules d'insecte (voir pp. 129,130).

## 2. Identification de nouvelles protéines

Plusieurs séquences internes et *N*-terminales ont été obtenues pour de nouvelles protéines de différentes masses moléculaires (tableau VII). Les séquences obtenues pour les protéines de 16 et 18 kDa ont permis l'identification de ces deux protéines (figure 12). Leurs séquences peptidiques ne correspondaient à aucune EST présente dans les banques de données. Nous avons donc effectué des recherches d'homologies de type BLAST sur les séquences génomiques d'*A. thaliana* disponibles (banque de donnée *Arabidopsis thaliana* Data Base). Ceci nous a permis d'identifier les gènes d'*A. thaliana* codant le polypeptide de 16 kDa (GeneBank, n° d'accèsion : ACOO5309) et le polypeptide de 18 kDa (EMBL, n° d'accèsion AB009053). Ces gènes sont localisés respectivement sur le chromosome II et le chromosome V d'*A. thaliana*. Deux gènes codant pour le polypeptide de 16 kDa ont été identifiés appelés *ie16-1* et *16-2*. Le gène codant pour la protéine IE16-1 d'*Arabidopsis thaliana* est l'homologue de IE16 d'épinard. La protéine p16-2 d'*A. thaliana* présente moins d'identité avec les séquences internes de la protéine d'épinard. Les protéines IE16-1 et p16-2 présentent 44 % d'identité et 62 % de similarité entre elles, sur 160 acides aminés (les 49 premiers acides aminés ne sont pas pris en compte, ils correspondent à la séquence de transit des protéines). Ces deux gènes ne présentent pas d'introns (figure 13) et aucune EST correspondante n'a été trouvée dans les banques de données. En revanche, le gène codant pour le polypeptide de 18 kDa contient plusieurs introns de grande taille (figure 14). En utilisant la séquence génomique, nous avons identifié une EST correspondant à la séquence 5' codant pour la

partie *N*-terminale de la séquence de transit du polypeptide de 18 kDa. Nous avons obtenu cette EST (clone ABRC, 9604T7, Genbank, n° d'accèsion T21692) provenant du *Biological Resource Center* (DNA stock center, Ohio State University, USA), et nous en avons déterminé la séquence complète (figure 15). L'analyse des séquences polypeptidiques déduites des ADNc d'*A. thaliana* confirment les fortes similarités avec les peptides séquencés d'épinard. Les protéines IE16-1 et IE18 d'*A. thaliana* présentent respectivement 76 % d'identité et 85 % de similarité (sur 33 acides aminés) avec les peptides de IE16 d'épinard, et 60 % d'identité et 88 % de similarité (sur 58 résidus) avec les peptides de IE18 d'épinard.

De plus, les profils d'hydrophobicité de ces protéines (figures 12D, 12E), déterminés d'après les séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques, correspondent aux profils attendus pour des protéines provenant d'extraits chloroforme/méthanol. En effet, les protéines IE16-1 et IE18 contiennent respectivement 3-4 et 4-5 domaines transmembranaires putatifs. D'autre part, la valeur déterminée par le rapport du nombre de résidus de la protéine sur le nombre d'hélices transmembranaires pour ces deux polypeptides (45 et 43 pour les protéines matures) est similaire à celle obtenue pour les protéines très hydrophobes comme IE30 (49), IE45 (38) et IE10 (62). Par comparaison, les valeurs obtenues pour des protéines moins hydrophobes comme IE37 (129) sont 2 à 3 fois plus fortes (tableau VIII).

Protéine	Nombre de résidus		Hélices TM	Res./TM		Point isoélectrique	
	Précurseur	Mature		Précurseur	Mature	Précurseur	Mature
<b>IE45</b>	569	477	12-13	45	38	9,7	9,2
<b>IE37</b>	344	323	2-3	138	129	9,5	9,5
<b>IE30</b>	404	330	6-7	62	49	9,7	9,4
<b>IE18</b>	243	193	4-5	54	43	10,1	9,8
<b>IE16</b>	208	157	3-4	59	45	10,3	9,7
<b>OE10</b>	n.a.	62	1	n.a.	62	n.a.	6,1

**Tableau VIII. Paramètres physico-chimiques de quelques protéines de l'enveloppe du chloroplaste extraites dans les solvants organiques et identifiées.** Les valeurs de masse moléculaire et de point isoélectrique ont été calculées d'après Bjellqvist *et al.* (1993,1994) et Wilkins *et al.* (1998a) en utilisant les séquences complètes des protéines ou les formes matures. Les segments transmembranaires ont été déterminés d'après Hofmann & Stoffel (1993). Les séquences primaires (et les fonctions putatives ou non) ont été obtenues respectivement à partir de : IE45 (transporteur d'oxoglutarate/malate, Weber *et al.*, 1995), IE37 (méthyltransférase dépendante de la SAM, Teyssier *et al.*, 1996), IE30 (transporteur de phosphate/triose phosphate, Flügge *et al.*, 1989), IE18 et IE16 (ce travail), IE10 (Salomon *et al.*, 1990). Pour les protéines de la membrane interne, les séquences *N*-terminales utilisées ont été définies ou prédites à partir des références citées ci-dessus. Pour IE16, la séquence *N*-terminale a été estimée par similarité avec le séquençage *N*-terminal de la protéine d'épinard. Pour IE18, une taille de 50 résidus a été estimée pour la séquence de transit, en utilisant la taille de la protéine après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes et la taille moyenne des séquences de transit des protéines de la membrane interne de l'enveloppe. Res./TM : rapport du nombre de résidus sur le nombre putatif d'hélices transmembranaires. n.a., non adapté (la protéine OE10 n'est pas maturée lors de son insertion dans la membrane externe de l'enveloppe, Salomon *et al.*, 1990).

<b>A – IE16-1</b>	
ccctctagtagtaccatatatagggccatttatatagctaagtcggcccaattatggtgtagtggtgcgcg	-118
gccaaattttagattcgaaaacggcagcggttgagctgttactttttttgctcttctgtcaacaaat	-49
cgacactgccgactaaacagcgaaaatccccaaacaaaaaaataaaagaatggcggtctctgtgctttct	21
<b>M A S L C L S</b>	7
ctccaccaaaccctaactaatccccctgtcgggtcccagatgcagaccactcgctctccttccccggaa	90
<b>L H Q T L T N P L S A P R C R P L S L S F P G</b>	30
tcctcaaccttctcgatccgcccctctagcagacgcgcaaccgccttgacgaccgcgctcctacacc	159
<b>S S T F S I R P S S R R A T A L T T R A S Y T</b>	53
ccgacgcccggcgactgagcgcgtgatttcgatagcgtcgtacgcgctgccgttcttcaattctctgcag	228
<b>P T P A T E R V I S I A S Y A L P F F N S L Q</b>	76
tacggggcggttctggttcgcgagtagcccaagggtgggattgctggttcgagccaatcttcccaatcctg	297
<b>Y G R F L F A Q Y P R L G L L F E P I F P I L</b>	99
aacctgtacagatcgggtgccgtacgcgagcttcgtggcattcttcgggctgtacctgggagtggtgagg	366
<b>N L Y R S V P Y A S F V A F F G L Y L G V V R</b>	122
aaacagagtttcagtagctgtaggttcaacgcgtagcagcgggtgacgctggatgtgctcctggcg	435
<b>N T S F S R Y V R F N A M Q A V T L D V L L A</b>	145
gttccgggtgctgctgacccgaatactggatccgggtcaaggaggcgggtttggaatgaaggcgatgatg	504
<b>V P V L L T R I L D P G Q G G G F G M K A M M</b>	168
tgggggcacacgggggttttcgtcttcagctttatgtggtttgtgtatggagtcgtcagctccttactc	573
<b>W G H T G V F V F S F M C F V Y G V V S S L L</b>	191
ggcaaaactccatacattccatttgcgtgtagcgcggtagacaactc <u>taattccggccaatatct</u>	642
<b>G K T P Y I P F V A D A A G R Q L -</b>	208
acctcactcagtggttcgggttttcgattctagaatcgggtatttctgggtttataagagagaccaaata	711
atcagtggtgtaattaaccattaccggttttaaaaaaatatttttggttatactcccaacat	774
<b>B – p16-2</b>	
tagaaagataagaagacgacacaatgttttaagctaaacttttaaacagagtgagggttagtttatta	-63
tcctctcatcatgtgtaagcagtccttcagttttgtgtgaagtgaacaaaaacagagcaaaatggca	6
<b>M A</b>	2
ataatatctcagtttttgcctcattaccatctctcaccggaaccctaaccctaaccgggtcgttctttt	75
<b>I I S Q F F A P L P S L T G T L T L T G R S F</b>	25
ctccctctaaaccttgatacccaattccccaaaacctagactttccagggacagagccgccactcgtat	144
<b>L P L N L D T Q F P K P R L S R D R A A T L V</b>	48
ctccaatccaaggggtgatgattccgctcgatgcacggatcggataatctcagccgtctgttacttctac	213
<b>L Q S K G D D S V D A S D R I I S A V C Y F Y</b>	71
ccattcttcgatgggattcaatacggcaaatcatcatcacacagtagccaacctttcagattctcatc	282
<b>P F F D G I Q Y G K F I I T Q Y Q P F Q I L I</b>	94
caacctttgtttcccgcaatcagagctttccafagctttccctttcaatgggtttcttatcttcatcact	351
<b>Q P L F P A I R A F K S F P F N G F L I F I T</b>	117
ctctacttcgctcgttgtgaggaaccctaatttcagcaggtacgtcaggttcaacacagtagcagggcatt	420
<b>L Y F V V V R N P N F S R Y V R F N T M Q A I</b>	140
gtgcttgatgtggttggattttcccggatttgccttgagaggagctttaatcctagagatgggtttgggt	489
<b>V L D V L L I F P D L L E R S F N P R D G F G</b>	163
ttagatggtgatgagtttggacagcagcagtggttccctcttcttgcctgtctctttgatctatggattc	558
<b>L D V V M S L D S T V F L F L L V S L I Y G F</b>	186
tctgcttgcttgggtctgacccccgaggttgccctcttgggtgagggctgctgataggcaagtcctt	627
<b>S A C L F G L T P R L P L V A E A A D R Q V L</b>	209
<u>tgattcaataatatctttgtatgtaacacatttgcgtgtagtaaaccttctgtattggatcgctttctg</u>	696
-	
ataatcaaaacatacaatgtaactttttgatccaatgaaaagggttctgcaagacttttgcaatagag	765

**Figure 13. Séquences nucléotidiques et peptidiques déduites des gènes d'Arabidopsis thaliana codant les protéines IE16-1 et p16-2.** La séquence en acides aminés (numérotation indiquée sur la colonne de gauche) est donnée en-dessous de la séquence nucléotidique (numérotation indiquée sur la colonne de droite). **A.** Séquences nucléotidique et peptidique de IE16-1. **B.** Séquences nucléotidique et peptidique de p16-2. Les zones grisées correspondent aux régions homologues aux peptides séquencés chez l'épinard. Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés.

taatacacatattttgctgtgtgtatataaataaaaaacatgcatacatgtatcatttgcctgtctcctatttggt	-108
aagaaaacagagagaatcggtatTTTTtagccttttgctaagatattttgatcaaaaaatcccacttttgagcggctc	-33
tatctttatttctccacctcaaaggaccattttctc <u>atgg</u> ccttctgttccgggtgagacctctacctctctctccg	42
<b>M A S V P V R P L L R R</b>	<b>14</b>
gaacatcacctcgacgacggcttcgaaatcatctccaatgctcgccaacgtttcgagccggcatttctctcgggat	117
<b>N I T S T T A S K S S P M L A N V S S R H S L G I</b>	<b>39</b>
ctctacgtatgatgaattttgaaagcaataaaaaactccggcaactgtgaaccaccggcggcgagtaagtaacggt	192
<b>S T Y D E F L K Q I K T P A T V N H R R R V S T V</b>	<b>64</b>
ggtggcgtcggcgggaaacttgacggcgccgctcgtgggattcgtggaagcctgataagacggcggcggtacggc	267
<b>V A S A G N L T A P S W D S W K P D K T A A A T A</b>	<b>89</b>
ctctttgctgagtgatttacaataaataaactgctgctggttagtcattttaaagaattactatttactaattactaa	342
<b>L L L S D V I W P A A</b>	<b>100</b>
tttagtgatttaagatcacaatttaattagatattttttgtcaaatgctttgagatataaattcttttactaat	417
gttttctcgatcgtcaaaaattgattgctcaatcagaagaactacaagggcgatttaggtaaaaaaagaagag	492
agaagaagtgcacaaaagaaaataaaattagaaaattaatggacaattataatattaatatttctgactgact	567
aaaagatgagtatagaaaaaatatggagagagtcagagagagaatgtgtcttttcttaaggccaaaaggctattc	642
atatgaacctttaccgcttogaatttgaccaattttatgtattttacctgaactagctagcttagtatttgact	717
ataaatggtgtgatttacaataaataaacttaaaaaatagaactctaataaatttgataaaagatatta	792
attacctcaaaagatgaaaattagttatgacataaataatccaagattaagtaactgtagttaaaggttg	867
aatatctgtatctaaaaaaaagagttaataaattgaatcgtggcatgttgatttgaatatgtttgcaaat	942
ccttaatgatgggaaatagcatgcaagtcaaacctatttgttctgtagagaatcttagttgctgttagtcaaa	1017
ccctatgctgacagagagcttatattttatttcaaggtttatagctgacttcatctattattatgaaact	1092
atattcatctgtgtctcagctatagttagtttaattacccatctacggtttcaacttgatctgaatttttagc	1167
ggaccatggttgcataataatattggattcaattttgttataggtattgtatcttatcatatgtaactcttt	1242
tgtagagcctttacaaaaaatgtgagtagtataataccgttttgttttggtttcttaatttggttttat	1317
gagtaggagcgtttgctggcaatggcattattgggaagaatggatcaaatgctatctccgaaaggcatttcaatgt	1392
<b>G A F A A M A L L G R M D Q M L S P K G I S M S</b>	<b>124</b>
cagttgcaccacttggcgcagctctccgccatttcttcatcaccctctctgctcctgctcgggtaaatcttt	1467
<b>V A P L G A V S A I L F I T P S A P A A R</b>	<b>145</b>
agttaacgcttttccatataatagcggctcaattatatttgcgggttaaacgcaaacgcttcattgtctttctg	1542
tgagacaaaaaatgcaaataccaaaagtgtgtttaggatttggatggtgtgtaacaaacatagaggaattgaa	1617
taatacaaaagtagaaagttagtggtagaggagacatttccactaagttctatatccataagctagttgaagat	1692
tttcttcaattttgttcttgtgcttacacttttctatggaataaacttagagggtccactattttatcgttgatt	1767
gatactttcatatatttggataaattagtcacaacctatttcagccatcttctcatgtttagattggaagagatg	1842
ccatcacatcaagttaaaatagaaacttgaagtactagtaatttggaatttgtcatcgtatcagttatttaactg	1917
attaattgaggagtgtgttttgtgtttcttatattttcagaaatacaaatattttggctcaaataggttgtgc	1992
<b>K Y N I F L A Q I G C A</b>	<b>157</b>
tgcgattgggggtgtagctttctcgtcttccggcccagcgtggctcgccggagtgctgcccctcgccgtccat	2067
<b>A I G V V A F S V F G P G W L A R S V A L A A S I</b>	<b>182</b>
cgcttttatggctcattactcgtgccaatcaccctctcgtgtaaatatttacttctttaaatttttaccgaaatcag	2142
<b>A F M V I T R A N H P P</b>	<b>194</b>
aaattgttttcttgattcaaagtttttgaaactcttttcataaaaatgatataaatttcacatgttcgtattttgac	2217
attgttattataaaaaggaaaaatgatgcaaatgaatattttttttaaacaactctgacttagtgatttttag	2292
cccatatttttaaggaaagatttgaatcaaaccaaaaagcccaaaaagaaaccatttattccacctgatctg	2367
aaaaatgtaataaataactggtcccgacgttttaggtataccttcataaataacctgaaacttttgggtggag	2442
cagaaacgtcccccttatataactcttcacaattttctcagctctttaaattaagaaagaaagtcaaatgcgat	2517
tttattattattttgcttctcgtcaattaatttacatattttgagagttgatattgattattatctataattc	2592
atctgataaaattacagcggcgagcttaccactaatgtcatagatggagcaaaagttccatcacttgaatttctg	2667
<b>A A S L P L M F I D G A K F H H L N F W</b>	<b>214</b>
gtacgcattgttcccagggtgcagctgctgtgtcatcctctcgtccttctcgtgaagttttgtaatttctcaaaaaca	2742
<b>Y A L F P G A A A C V I L C L L</b>	<b>230</b>
taaaaatcaagataatgtttaatggcgaatattttgggtataagatttaacgtgataattaagtaactaatctgatt	2817
caaattgatttcttggcagcaatcgatcgatgttacttgaaggaaaacatgaaattttgatgaatcaccaagcg	2892
<b>Q S I V C Y L K E N M K F -</b>	<b>243</b>
acatgtacgatcgaattaatgatataataacatacatatcgatggaaaatcttgtgaaaatatttgattcata	2967
tgtatacacttgatgaacgtatgtaaatgactaaataaattattaagttcattcaatattatcgtggctc* <b>tctcc</b>	<b>*poly-A</b>
gattccttattatcatttttcttaatttctacataaataaacagtttaaacacctatacaaaaggattatacagagtta	3117

**Figure 14. Séquences nucléotidique et peptidique déduites du gène d'*A. thaliana* codant pour la protéine IE18.** La séquence en acides aminés (numérotation indiquée sur la colonne de droite) est donnée au-dessous de la séquence nucléotidique (numérotation indiquée sur la colonne de gauche). La flèche indique l'extrémité 5' de l'EST d'*Arabidopsis thaliana* (voir figure 15). L'étoile représente l'extrémité 3' de l'ADNc séquencé (polyadénylation, voir figure 15). Les introns sont indiqués par des caractères en italique. Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés. Les zones grisées correspondent aux régions homologues aux peptides séquencés chez l'épinard.

attggctaagaaaacagagagaatcggtatTTTTtagcctttgctaagatatTTTgatcaaaaatccac	-48
TTTTgagcgggtcttatctttattctccacctcaaaggaccatttctc <u>atgg</u> cttctggtccggtgagac	21
	<b>M A S V P V R</b>
	7
ctctacctcttcttcgccgaacatcacctcgacgacggcttcgaaatcatctccaatgctcgccaacgt	90
<b>P L P L L R R N I T S T T A S K S S P M L A N</b>	30
gttcgagccggcatttctctcgggatctctacgtatgatgaatTTTTgaagcaataaaaactccggcaa	159
<b>V S S R H S L G I S T Y D E F L K Q I K T P A</b>	53
ctgtgaaccaccggcggcgagtaagtagcgggtggcggcggcgggaaacttgacggcgccgctggtggg	228
<b>T V N H R R R V S T V V A S A G N L T A P S W</b>	76
attcgtggaagcctgataagacggcggcggctcttttgctgagtgacgtcatatggcctgctg	297
<b>D S W K P D K T A A A T A L L L S D V I W P A</b>	99
ctggagcgtttgcggaatggcattattgggaagaatggatcaaatgctatctccgaaaggcatttcaa	366
<b>A G A F A A M A L L G R M D Q M L S P K G I S</b>	122
tgtcagttgcaccacttggcgcagctctccgccattcttttcatcacccttctgctcctgctgctcgga	435
<b>M S V A P L G A V S A I L F I T P S A P A A R</b>	145
aatacaatatatTTTTggctcaaataagggttgctgctgagttgggggtgtagctttctccgtcttcggcc	504
<b>K Y N I F L A Q I G C A A I G V V A F S V F G</b>	168
caggctggctcgcccgagtgctgcacctcgccgcttccatcgcttttatggctcattactcgtgccaatc	573
<b>P G W L A R S V A L A A S I A F M V I T R A N</b>	191
accctcctgcccggagcttaccactaatgttcatagatggagcaaagttccatcacttgaatttctggt	642
<b>H P P A A S L P L M F I D G A K F H H L N F W</b>	214
acgcattgttcccagggtgcagctgcttgtgtcatcctctgccttctccaatcgatcgtatgttacttga	711
<b>Y A L F P G A A A C V I L C L L Q S I V C Y L</b>	237
aggaaaacatgaaatTTT <u>tga</u> tgaatcaccaagcgacatgtacgatcgaattaatgatataataaca	780
<b>K E N M K F -</b>	243
tacatatcgatggaaatcttgtgaaaatatttgattcatatgtatacacttgatgaacgtatgtaaatg	849
actaaataattattaagttcattcaatattatcgtggctctaaaaaaaaaaaaaaaa	

**Figure 15. Séquences nucléotidique et peptidique déduites de l'ADNc codant la protéine IE18 d'*A. thaliana*.** La séquence en acides aminés (numérotation indiquée sur la colonne de droite) est donnée sous la séquence nucléotidique (numérotation indiquée sur la colonne de gauche). Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés. Les zones grisées correspondent aux régions homologues aux peptides séquencés chez l'épinard.

Les séquences peptidiques obtenues pour les polypeptides p25 et IE41 (voir tableau VII) n'ont pas encore permis d'identifier avec certitude les séquences complètes de ces protéines. Enfin, la séquence obtenue pour le polypeptide de 35 kDa (p35, voir tableau VII) a permis l'identification d'une annexine dont l'étude est décrite dans le chapitre III.

### III. CONFIRMATION DE L'IDENTITE DES PROTEINES D'EPINARD ET D'ARABIDOPSIS : L'EXEMPLE DE IE18

Les séquences peptidiques ont été obtenues pour les protéines de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard, alors que les séquences nucléotidiques proviennent d'analyses de bases de données d'*Arabidopsis thaliana*. Il était donc nécessaire d'établir la correspondance entre ces séquences. Nous avons choisi de le faire pour une des protéines identifiées, IE18. Nous avons donc cloné l'ADNc codant cette protéine chez l'épinard. Pour cela, plusieurs approches ont été utilisées.

#### A. Clonage de l'ADNc et du gène codant la protéine IE18 d'épinard

Afin d'obtenir l'ADNc codant la protéine IE18, nous avons criblé une banque d'ADNc d'épinard dans  $\lambda$ gt11 avec les anticorps polyclonaux purifiés dirigés contre le peptide



KATPSPSLSDVLWPSLGA obtenu à partir de la protéine IE18. Sur 360000 clones criblés, 25 clones positifs ont été obtenus mais après séquençage aucun ne contenait la séquence du peptide. L'absence de clones contenant la séquence de la protéine IE18 est probablement due à une représentation trop faible de l'ADNc correspondant dans la banque d'expression.

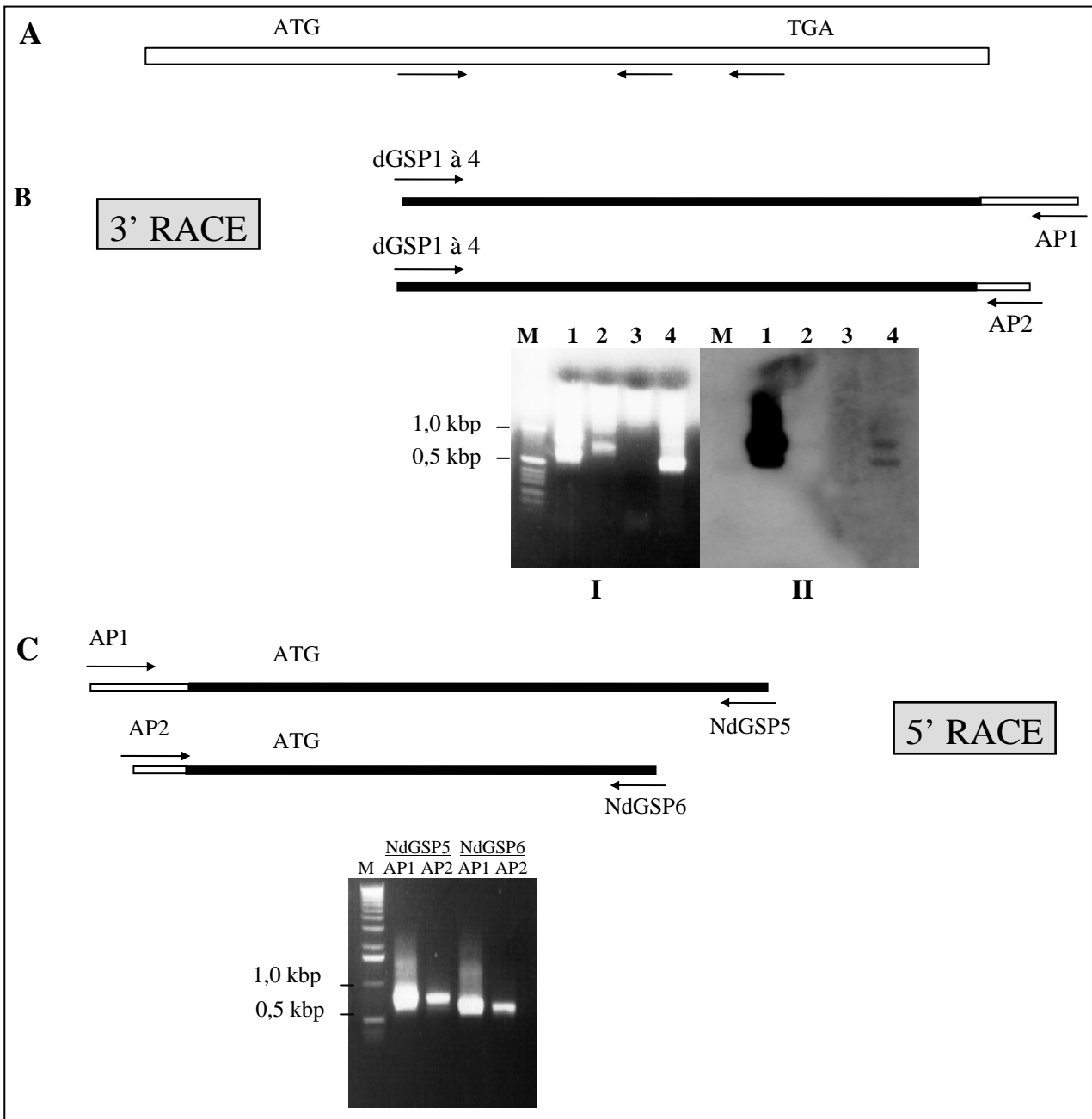
Nous avons alors essayé de cloner le gène codant la protéine IE18 à partir de l'ADN génomique. A cette époque nous ne disposions que de deux séquences internes pour la protéine IE18, ce qui ne nous avait pas encore permis d'identifier le gène correspondant chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons donc utilisé des oligonucléotides dégénérés (inosines) définis à partir de ces deux séquences internes comme sondes nucléiques (voir annexe 4). Les différentes étapes consistent à effectuer une analyse par Southern avec des oligonucléotides dégénérés sur de l'ADN génomique, préalablement digéré par plusieurs enzymes de restriction. Les régions d'ADN marquées par les sondes sont découpées à partir d'un gel d'agarose, et l'ADN en est extrait. Ces fragments d'ADN génomique sont ensuite clonés, et des criblages successifs sont réalisés jusqu'à l'obtention d'un clone pur.

Ces essais de clonage ont été effectués à partir d'ADN génomique total, d'ADN chloroplastique et d'ADN nucléaire. Après digestion de ces ADN et analyse par Southern, quelques régions étaient marquées par les différentes sondes sur l'ADN nucléaire et génomique. Malheureusement, le clonage de ces fragments d'ADN dans différents types de vecteurs et de souches bactériennes n'a pas permis l'obtention de clones recombinants.

## **B. Clonage de l'ADNc codant la protéine IE18 d'épinard par 3' et 5' RACE**

Nous avons obtenu une nouvelle séquence peptidique pour IE18 (DVLWPSLGAFAGMAML GKVD, voir séquence 2, tableau VII) qui présentait l'avantage de correspondre à une séquence nucléotidique peu dégénérée. Nous avons alors entrepris le clonage de l'ADNc codant pour la protéine IE18 d'épinard en utilisant la technique appelée RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds). Pour cela, nous avons utilisé un système commercial (Marathon cDNA amplification kit, Clontech) en nous conformant aux recommandations du fabricant. Le clonage de l'ADNc a nécessité plusieurs étapes décrites ci-dessous.

La première étape consiste à construire une banque d'ADNc à partir des ARN poly(A) présents dans les feuilles d'épinard. Pour cela, nous avons utilisé les six premières paires de feuilles de jeunes plants à partir desquels nous avons préparé les ARN totaux et purifié les ARN poly(A). Le premier brin des ADNc est synthétisé à l'aide d'une amorce poly(T). Cette amorce se fixe en 3' des ARNm au niveau de la queue poly(A), et permet la transcription inverse des ARNm par action de la transcriptase inverse. La synthèse du deuxième brin est réalisée en utilisant des amorces aléatoires, ce qui permet un amorçage de l'ADN polymérase sur la totalité des premiers brins. L'utilisation de l'ADN polymérase T4 permet d'obtenir des ADNc avec des bouts francs sur lesquels sont greffés les adaptateurs du système, partiellement double brins. On dispose alors d'une banque d'ADNc ligués aux adaptateurs.



**Figure 16. Obtention de l'ADNc codant la protéine IE18 d'épinard par 3' et 5' RACE.** **A.** Positions des amorces spécifiques du gène utilisées pour le 3' et le 5' RACE. Les codons initiateur (ATG) et terminateur (TGA) de l'ADNc de IE18 sont indiqués. **B.** Amplification de la partie 3' de l'ADNc de IE18 par 3' RACE. L'ADNc est schématisé par le rectangle noir, le rectangle blanc correspond aux adaptateurs fixés aux extrémités des ADNc. Les amorces AP1 et AP2 sont spécifiques des adaptateurs. Plusieurs oligonucléotides dégénérés (dGSP1 à 4) ont été utilisés comme amorces spécifiques du gène. Une première amplification est réalisée avec les amorces dGSP1 à 4 et AP1, la matrice obtenue est ensuite utilisée pour une deuxième amplification avec les amorces dGSP1 à 4 et AP2. L'analyse sur gel d'agarose (I) montre les fragments d'ADN obtenus après cette deuxième amplification. Les numéros des puits correspondent aux différentes amorces dégénérées. Une analyse par Southern (II) en utilisant une sonde spécifique du gène (EST d'*Arabidopsis*) permet de déterminer le fragment (amplification 1) correspondant à l'extrémité 3' de l'ADNc. **C.** Amplification de la partie 5' de l'ADNc de IE18 par 5' RACE. La position des deux amorces non dégénérées (ndGSP5 et 6) par rapport à l'ADNc est indiquée. Une amplification est réalisée avec les amorces AP1 et AP2 et chacune des amorces spécifiques du gène.

La deuxième étape consiste à amplifier spécifiquement l'extrémité 3' du messenger de IE18. On utilise pour cela une amorce spécifique du gène et une amorce du système spécifique de l'adaptateur (AP1). Nous avons utilisé 4 oligonucléotides dégénérés (dGSP 1 à 4) obtenus à partir d'une séquence interne de IE18 (GAFAGMAM). Les adaptateurs ligués aux ADNc partiellement double brins ne contiennent pas de site de fixation pour AP1. Ainsi, lors du premier cycle de la PCR, seule l'amorce spécifique du gène peut s'hybrider à la matrice IE18 (figure 16), ce qui permet l'élongation vers l'extrémité 3' du messenger, et la création du site d'hybridation de l'amorce AP1. Pour les cycles suivants, les deux amorces peuvent se fixer permettant une amplification exponentielle de l'ADNc d'intérêt. Une deuxième amplification est réalisée en utilisant une autre amorce spécifique des adaptateurs (AP2), ce qui permet d'éliminer des amplifications non spécifiques (amorçage d'AP1 sur des régions ne correspondant pas aux adaptateurs).

La figure 16B montre que plusieurs fragments sont amplifiés avec les 4 amorces utilisées. Afin de déterminer la nature des fragments amplifiés, une analyse par Southern avec une sonde spécifique du gène (EST d'*Arabidopsis*) a été réalisée. Seuls les fragments amplifiés avec l'oligonucléotide dGSP1 (600 et 800 pb) sont révélés par la sonde. Ces deux fragments ont été clonés dans un plasmide pBluescript et séquencés. Le fragment de 800 pb correspond à la partie 3' du gène de IE18, le fragment de 600 pb correspond à un gène codant une protéine ribosomale.

La troisième étape consiste à amplifier l'extrémité 5' de l'ADNc codant IE18 de la même manière que l'extrémité 3' mais en utilisant une autre amorce spécifique du gène (figure 16C). Ayant obtenu la séquence de l'extrémité 3' du gène, nous avons pu utiliser deux amorces non dégénérées, ndGSP5 et ndGSP6. Pour chaque amorce spécifique du gène, une amplification a été réalisée avec les amorces AP1 et AP2. L'amorce ndGSP6 se situe plus en amont dans le gène codant IE18 et génère ainsi un fragment d'ADN plus petit que celui obtenu avec l'amorce ndGSP5. Les fragments correspondant à l'extrémité 5' du gène ont ensuite été séquencés.

Les séquences des amorces spécifiques du gène que nous avons utilisées sont les suivantes :

Séquence peptidique	G	A	F	A	G	M	A	M
Amorce dGSP1	GG(ATGC)	GC(ATGC)	TT(CT)	GC(ATGC)	GG(ATGC)	ATG	GCA	ATG
Amorce dGSP2	GG(ATGC)	GC(ATGC)	TT(CT)	GC(ATGC)	GG(ATGC)	ATG	GCT	ATG
Amorce dGSP3	GG(ATGC)	GC(ATGC)	TT(CT)	GC(ATGC)	GG(ATGC)	ATG	GCC	ATG
Amorce dGP4	GG(ATGC)	GC(ATGC)	TT(CT)	GC(ATGC)	GG(ATGC)	ATG	GCG	ATG
Amorce ndGSP5	TAG	TCC	ATG	AAG	CTT	CGC	TCC	ATC
Amorce ndGSP6	CCA	AGA	GTG	TGA	ATG	CTA	TGA	CTC

Les amorces dGSP1 à 4 diffèrent les unes des autres seulement par un seul nucléotide indiqué en caractère gras. La figure 16A montre la localisation de ces amorces sur l'ADNc codant IE18. La séquence du gène codant la protéine IE18 d'épinard obtenue par cette approche est présentée figure 17. La protéine d'épinard IE18 présente 68 % d'identité et 89 % de similarité avec la protéine IE18 d'*Arabidopsis thaliana* (figure 18). Ces pourcentages ne prennent pas en compte les 55 premiers acides aminés qui correspondent à la séquence de transit putative. Ces résultats montrent que les protéines IE18 d'épinard et d'*Arabidopsis* sont identiques et confirment ainsi l'identification de la séquence d'*A. thaliana* obtenue pour la protéine IE18. Ces résultats valident par ailleurs l'identification de la séquence d'ADNc d'*Arabidopsis* obtenue pour la protéine IE16.

ctttttttccctttaataattctcaattggtcggtccatttcactatctttatcaattttt	0
tctcagcacaacaagaacaacaacttggttttct <u>taa</u> attaaagatctaaaa <u>ATG</u> CAA	60
	M Q 2
TCCAATGTTCTAAAAACCTCATATTTTCTCCATTGTTTCTCCCTCGAAGATTCTAAACA	120
I Q C S K N L I F S P L F P P S K I L N	20
GGAAGAACATTAAACAATATGTGAACCTTGAGTAATAGTAATGGAGGATCATCGGGTGTAT	180
R K N I K Q Y V N L S N S N G G S S G V	40
TGTTTACGAGTTTTCTTAAGAGAAGCGGTTTGTAGTACCGTGATAGCTTCTTCTCGA	240
L F T S F P K R R R C F S T V I A S S S	60
CTAATGTGAACGCACCTTTGTTTGATACTTGGTCACCTGATAAAGCTACTCCTTCTCCTT	300
T N V N A P L F D T W S P <b>D K A T P S P</b>	80
CTCTTAGTGATGTTCTATGGCCTTCTCTTGGGGCATTGCGGGAATGGCAATGTTGGGTA	360
<b>S L S D V L W P S L G A F A G M A M L G</b>	100
AGGTGGACCAATTGCTAGCACCAAAAGGATTATCAATGACGATAGCGCCATTAGGGGCTG	420
<b>K V D</b> Q L L A P K G L S M T I A P L G A	120
TTTGTGCTGTTTTATTTCATCACTCCTAAATCTCCAGCTGCAAGGAAATACAACATGTTCA	480
V C A V L F I T P K S P A A R K Y N M F	140
TGGCACAAATAGGGTGTGCAGCAATAGGAGTCATAGCATTACACTCTTGGGACCAGGTT	540
M A Q I G C A A I G V I A F T L L G P G	160
GGCTTTCCAGGGGTGCTTCCCTTGCCGCTTCCATTGCCTTCATGATTTACACCAAAATCTA	600
W L S <b>R G A S L A A S I A F</b> M I Y T <b>K</b> S	180
CTCACCTCCTGCTGCAAGTTTGCCATTATTGTTTATTGATGGAGCGAAGCTTCATGGAC	660
T H <b>P P A A S L P L L F I</b> D G A K L H G	200
TAAATTATTGGTACGCGTTATTTCTGGTGCAGCCGGATGTGTTCTCCTATCTCTCCTTC	720
L N Y W Y A L F P G A A G C V L L S L L	220
AAGAGATTGTTTACTATTTGAAGGAGAATTTCAAGTTT <u>tga</u> tccgtcaaaaagaaaaaga	780
Q E I V Y Y L K E N F K F -	233
aaaaagggttttgatttagagccctaattaagaaaggggaagttgagcaggagtgtgttacc	840
gagtacagtagatagtagttttttgaggcactcttaaaaatggtggacgaaggacacaagt	900
tgaagtactgatttagtattgcaaacagccaaatatatggagattccgtacaaaatgtaca	960
ggaaattggattcaagaattcaatgtaaaccgtaaattattattctttgtacaaaataaa	1020
attacaaatggtgtattaataaataataaagtttataa(c/t)caaaaaaaaaaaaaaaaa	1080

**Figure 17. Séquences nucléotidique et peptidique de la protéine IE18 d'épinard obtenues par 3' et 5' RACE.** La séquence nucléotidique de l'ADNc (numérotation à gauche) et la séquence polypeptidique (numérotation à droite) de la protéine IE18 sont indiquées. La séquence nucléotidique codante est indiquée par des lettres majuscules. Le codon initiateur et le codon de terminaison sont soulignés. Le codon de terminaison taa correspond au premier codon stop dans le cadre de lecture en 5' de la séquence codant la protéine IE18. Les séquences en acides aminés surlignées correspondent aux séquences internes de la protéine obtenues par microséquençage (tableau VII).

IE18So	.....MQIQCSK <b>N</b> LIF <b>S</b> PLFPP <b>S</b> K <b>I</b> LN <b>R</b> K <b>N</b> IKQYV <b>N</b> L <b>S</b> NSNGGSSGV <b>L</b>	43
IE18At	MASVPVRPLPL <b>L</b> RR <b>N</b> IT <b>S</b> TT <b>A</b> SK <b>S</b> SP <b>M</b> L <b>A</b> NVSS <b>R</b> H <b>S</b> LG <b>I</b> STYDEF <b>L</b> KQ <b>I</b> K	50
Cons	<b>*N*</b> <b>**</b> <b>*S</b> <b>*L</b> <b>*</b> <b>*S</b> <b>*</b>	
IE18So	-FT <b>S</b> FP <b>K</b> RR <b>R</b> CF <b>S</b> T <b>V</b> IAS <b>S</b> ST <b>N</b> V <b>N</b> AP <b>L</b> FD <b>T</b> W <b>S</b> P <b>D</b> KAT <b>P</b> SP <b>S</b> -- <b>L</b> SD <b>V</b> L <b>W</b> P	90
IE18At	TPAT <b>V</b> N <b>H</b> RR <b>R</b> - <b>V</b> ST <b>V</b> VA <b>S</b> - <b>A</b> GN <b>L</b> T <b>A</b> PS <b>W</b> DS <b>W</b> K <b>P</b> DK <b>T</b> AA <b>A</b> T <b>A</b> LL <b>L</b> SD <b>V</b> I <b>W</b> P	98
Cons	<b>**</b> <b>*RRR</b> <b>STV*AS</b> <b>**N*</b> <b>AP</b> <b>*D*W</b> <b>PDK*****</b> <b>LSDV*WP</b>	
IE18So	<b>S</b> L <b>G</b> A <b>F</b> A <b>G</b> M <b>A</b> M <b>L</b> G <b>K</b> V <b>D</b> Q <b>L</b> L <b>A</b> P <b>K</b> G <b>L</b> S <b>M</b> T <b>I</b> A <b>P</b> L <b>G</b> A <b>V</b> C <b>A</b> V <b>L</b> F <b>I</b> T <b>P</b> K <b>S</b> P <b>A</b> A <b>R</b> K <b>Y</b> N	140
IE18At	<b>A</b> A <b>G</b> A <b>F</b> A <b>A</b> M <b>A</b> L <b>L</b> G <b>R</b> M <b>D</b> Q <b>M</b> L <b>S</b> P <b>K</b> G <b>I</b> S <b>M</b> S <b>V</b> A <b>P</b> L <b>G</b> A <b>V</b> S <b>A</b> I <b>L</b> F <b>I</b> T <b>P</b> S <b>A</b> P <b>A</b> A <b>R</b> K <b>Y</b> N	148
Cons	<b>* GAF*A*MA*LG**DQ*L*PKG*SM**APLGAV A*LFITP *PAARKYN</b>	
IE18So	<b>M</b> F <b>M</b> A <b>Q</b> I <b>G</b> C <b>A</b> A <b>I</b> G <b>V</b> I <b>A</b> F <b>T</b> L <b>L</b> G <b>P</b> G <b>W</b> L <b>S</b> R <b>G</b> A <b>S</b> L <b>A</b> A <b>S</b> I <b>A</b> F <b>M</b> I <b>Y</b> T <b>K</b> S <b>T</b> H <b>P</b> P <b>A</b> A <b>S</b> L	190
IE18At	<b>I</b> F <b>L</b> A <b>Q</b> I <b>G</b> C <b>A</b> A <b>I</b> G <b>V</b> V <b>A</b> F <b>S</b> V <b>F</b> G <b>P</b> G <b>W</b> L <b>A</b> R <b>S</b> V <b>A</b> L <b>A</b> A <b>S</b> I <b>A</b> F <b>M</b> V <b>I</b> T <b>R</b> A <b>N</b> H <b>P</b> P <b>A</b> A <b>S</b> L	198
Cons	<b>*F*AQIGCAAIGV*AF** GPGWL*<b>R</b>* *LAASIAFM* T** HPPAASL</b>	
IE18So	<b>P</b> L <b>L</b> F <b>I</b> D <b>G</b> A <b>K</b> L <b>H</b> G <b>L</b> N <b>Y</b> W <b>Y</b> A <b>L</b> F <b>P</b> G <b>A</b> A <b>G</b> C <b>V</b> L <b>L</b> S <b>L</b> L <b>Q</b> E <b>I</b> V <b>Y</b> Y <b>L</b> K <b>E</b> N <b>F</b> K <b>F</b>	235
IE18At	<b>P</b> L <b>M</b> F <b>I</b> D <b>G</b> A <b>K</b> F <b>H</b> H <b>L</b> N <b>F</b> W <b>Y</b> A <b>L</b> F <b>P</b> G <b>A</b> A <b>C</b> V <b>I</b> L <b>C</b> L <b>L</b> Q <b>S</b> I <b>V</b> C <b>Y</b> L <b>K</b> E <b>N</b> M <b>K</b> F	243
Cons	<b>PL*FIDGAK H LN*WYALFPGAA*CV*L LLQ IV YLKEN KF</b>	

**Figure 18.** Alignement des séquences polypeptidiques des protéines IE18 d'épinard et IE18 d'*Arabidopsis thaliana*. Les résidus identiques sont indiqués en caractères gras, et les résidus identiques ou similaires sont surlignés en gris. So : *Spinacia oleracea*, At : *Arabidopsis thaliana*. Cons : séquence consensus entre les deux protéines. \*: résidus homologues. Ces protéines présentent 68 % d'identité et 89 % de similarité sur 188 acides aminés (ces pourcentages sont calculés à partir des séquences dans lesquelles sont exclus les 55 premiers acides aminés qui correspondent potentiellement au peptide de transit putatif). Les pourcentages d'identité et de similarité sur les précurseurs de ces protéines sont respectivement de 56 % et 78 %.

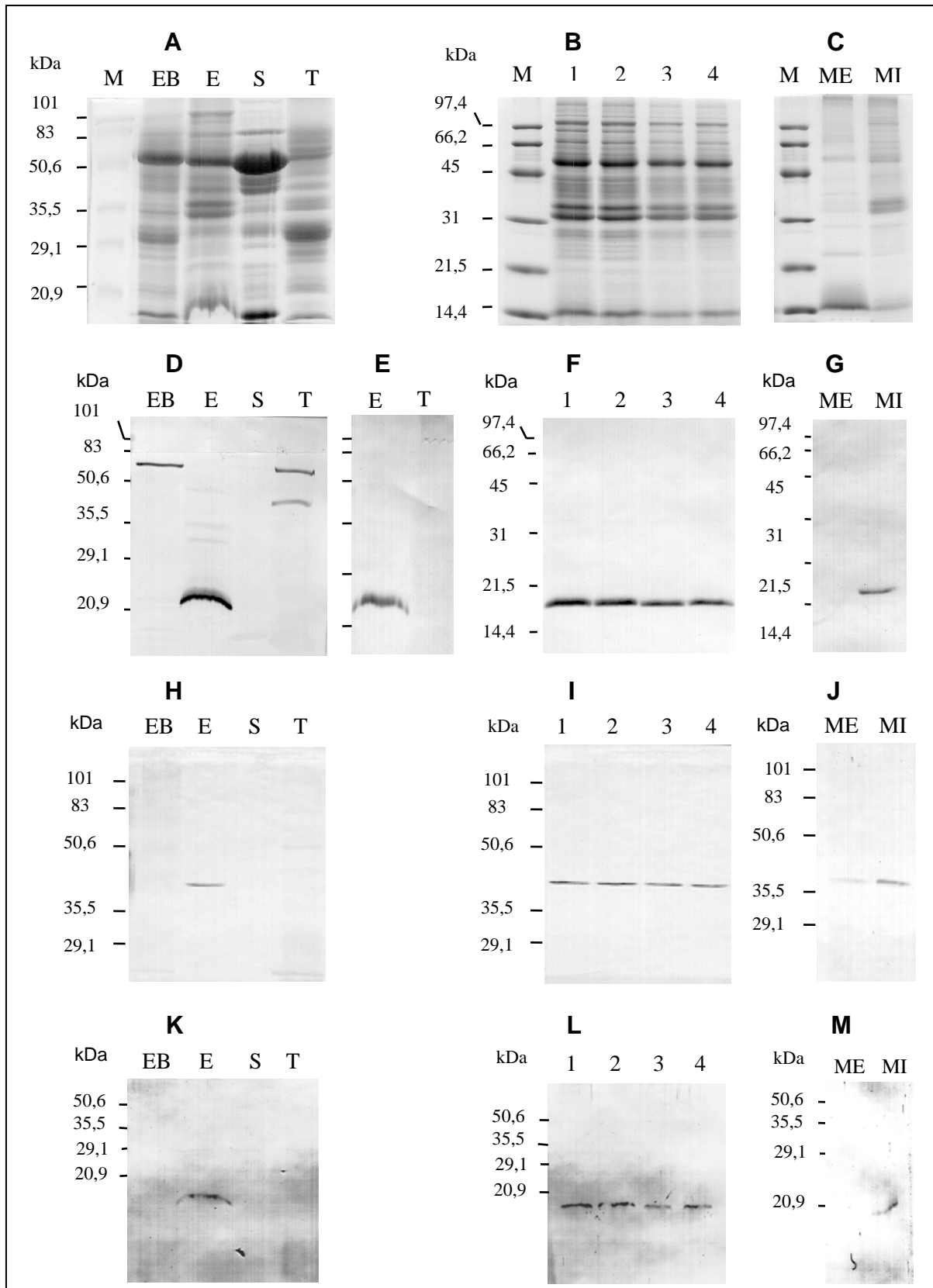
#### IV. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES POLYPEPTIDES DE 16, 18 ET 41 KDA

##### A. Obtention d'anticorps polyclonaux

Afin de valider la localisation subcellulaire des protéines identifiées, nous avons fait produire par des lapins des anticorps polyclonaux à partir de peptides synthétiques correspondant à certaines séquences internes obtenues. Les peptides synthétisés (SATTPATDRLISSIS, KATPSPSLSDVLWPSLGA et EAATLNPIDRK) correspondent respectivement aux protéines d'épinard IE16, IE18 et IE41. Les anticorps polyclonaux ont alors été utilisés pour déterminer la localisation subcellulaire des protéines correspondantes. Les anticorps polyclonaux dirigés contre IE18 détectaient en plus de IE18 une protéine de masse moléculaire élevée (figure 19D). Ce sérum a donc été purifié contre une colonne de Sépharose couplée à l'ovalbumine, protéine utilisée pour coupler le peptide avant l'immunisation. Le sérum purifié reconnaît uniquement la protéine de 18 kDa (figure 19E).

##### B. Localisation des protéines identifiées dans le chloroplaste

Les expériences d'immunolocalisation ont été effectuées sur différentes fractions protéiques provenant de feuilles d'épinard : un extrait total et les trois sous-fractions chloroplastiques



**Figure 19. Localisation subcellulaire des polyprotéides de 16, 18 et 41 kDa.**

**A, D, E, H et K :** Analyses par électrophorèse en conditions dénaturantes (A) des sous-fractions de feuilles et par marquage immunologique en utilisant des anticorps dirigés contre les peptides synthétiques de IE18 (D et E), IE41 (H) et IE16 (K). M, marqueurs ; EB, extrait brut de feuilles

d'épinard ; E, enveloppe du chloroplaste ; S, stroma du chloroplaste ; T, thylacoïdes. 50 µg de protéines par puits. Pour IE18, les analyses par immunodétection sur les sous-fractions de la feuille ont été réalisées avec le sérum immun non purifié dirigé contre le peptide de IE18 (D) et avec les IgG correspondantes purifiées sur l'ovalbumine couplée à une colonne de CNBr-sépharose (E).

**B, F, I, L :** Analyses par électrophorèse en conditions dénaturantes de protéines d'enveloppe provenant de chloroplastes traités à la thermolysine (B) et analyses correspondantes par immunomarquage avec les anticorps dirigés contre les peptides de IE18 (F), IE41 (I) et IE16 (L). M, marqueurs ; Puits 1 à 4, protéines de l'enveloppe obtenues après traitement des chloroplastes avec des concentrations de thermolysine de 0, 20, 50 et 100 µg/ml. 20 µg de protéines par puits.

**C, G, J, M :** Analyses par électrophorèse en conditions dénaturantes des protéines des membranes interne et externe de l'enveloppe (C) et les analyses correspondantes par immunodétection avec les anticorps dirigés contre les peptides des protéines IE18 (G), IE41 (J), IE16 (M). M, marqueurs ; ME, membrane externe de l'enveloppe ; MI, membrane interne. 10 µg de protéines par puits.

(enveloppe, stroma, thylacoïdes). La figure 19 (E, H et K) montre que les protéines de 16, 18 et 41 kDa sont détectées uniquement dans l'enveloppe du chloroplaste. Aucun marquage n'est visible dans les fractions correspondant au stroma et aux thylacoïdes. Ces protéines sont probablement présentes en petite quantité car seul un enrichissement dans l'enveloppe permet de les visualiser : elles ne sont pas détectées dans l'extrait brut. Ces observations confirment que les protéines sont effectivement localisées dans l'enveloppe.

Afin d'affiner la localisation subcellulaire de ces protéines, nous avons réalisé des immunomarquages sur des protéines d'enveloppe provenant de chloroplastes intacts traités par la thermolysine. Dans nos conditions expérimentales, la thermolysine hydrolyse uniquement les polypeptides localisés sur la face cytosolique de la membrane externe (Joyard *et al.*, 1983). La figure 19 (F, I, L) montre que les polypeptides de 16, 18 et 41 kDa sont toujours détectés après ce traitement. Ainsi, les régions reconnues par les anticorps ne sont pas accessibles au traitement protéolytique réalisé sur les chloroplastes intacts. Les polypeptides de 16, 18 et 41 kDa ne sont donc pas localisés dans le feuillet externe de la membrane externe.

Enfin, nous avons réalisé les immunomarquages sur des fractions d'enveloppe enrichies en membrane interne ou en membrane externe. La figure 19 (G, J, M) montre que ces trois protéines sont associées à la membrane interne de l'enveloppe. Nous appellerons ces polypeptides, IE16, IE18 et IE41, pour Inner Enelope polypeptides de 16, 18 et 41 kDa.

## **V. RELATION ENTRE L'HYDROPHOBICITE DES PROTEINES ET LEUR SOLUBILISATION DANS DES SOLVANTS OU DES DETERGENTS**

L'analyse des protéines extraites par les solvants organiques (voir figure 10) suggère que les protéines de l'enveloppe plus ou moins hydrophobes peuvent être extraites de manière différentielle en utilisant différentes proportions de chloroforme/méthanol. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la distribution de quelques protéines (IE18, IE30, IE37 et IE41) dans les différents mélanges chloroforme/méthanol avec leur solubilisation par différents détergents.

## A. Extraction dans les solvants organiques

La figure 20A montre que la protéine IE18, identifiée à l'aide des anticorps spécifiques, est bien extraite par les mélanges chloroforme/méthanol dans toutes les conditions analysées, sauf en présence de chloroforme ou de méthanol pur. Cette distribution est très proche de celle que nous avons observée pour le polypeptide IE30 (figure 10B). Ces analyses montrent aussi que IE30 a le même comportement que les protéines IE45, OE10 et IE16. Toutes ces protéines sont très hydrophobes et peuvent être solubilisées par la plupart des mélanges de chloroforme/méthanol. En revanche, la figure 20A montre que la solubilité de IE41 dans les extraits chloroforme/méthanol semble limitée aux mélanges 3/6 à 6/3 [v/v], ce qui est aussi le cas de la protéine IE37 (figure 10B). De plus, dans ces deux cas, une partie importante de la protéine n'est pas solubilisée par les différents mélanges chloroforme/méthanol.

## B. Solubilisation dans les détergents

Une autre manière de vérifier l'hydrophobicité des protéines est d'analyser leur comportement lors d'une solubilisation par des détergents. Nous avons donc incubé des préparations d'enveloppe en présence de deux types de détergents : le Triton X-100, détergent non-ionique, et le CHAPS, détergent zwitterionique. Les membranes ont ensuite été centrifugées afin de séparer les fractions solubilisées ou non par les détergents. Les protéines ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes. La figure 20B montre que la solubilisation de la protéine hydrophobe IE30 nécessite une concentration de détergent beaucoup plus importante que celle qui est nécessaire à la solubilisation de IE37. En effet, la protéine IE30 n'est jamais solubilisée par le CHAPS aux concentrations utilisées (figure 20B), alors que la protéine IE37 est solubilisée en présence de CHAPS 3 mM. De même, la protéine IE37 est solubilisée en présence de Triton X-100 0,2 % [v/v] alors qu'une concentration de 2 % [v/v] est nécessaire pour la solubilisation de la protéine IE30. Des résultats similaires ont été obtenus pour les protéines IE18 et IE41. En effet, si la protéine IE18 n'est pas solubilisée par des concentrations de CHAPS de 7 mM ou en présence de Triton X-100 0,2 % [v/v] (figure 20B), elle est totalement solubilisée en présence de Triton X-100 2 % [v/v]. En revanche, IE41 est solubilisée en présence de CHAPS 3 mM ou de Triton X-100 0,2 % [v/v].

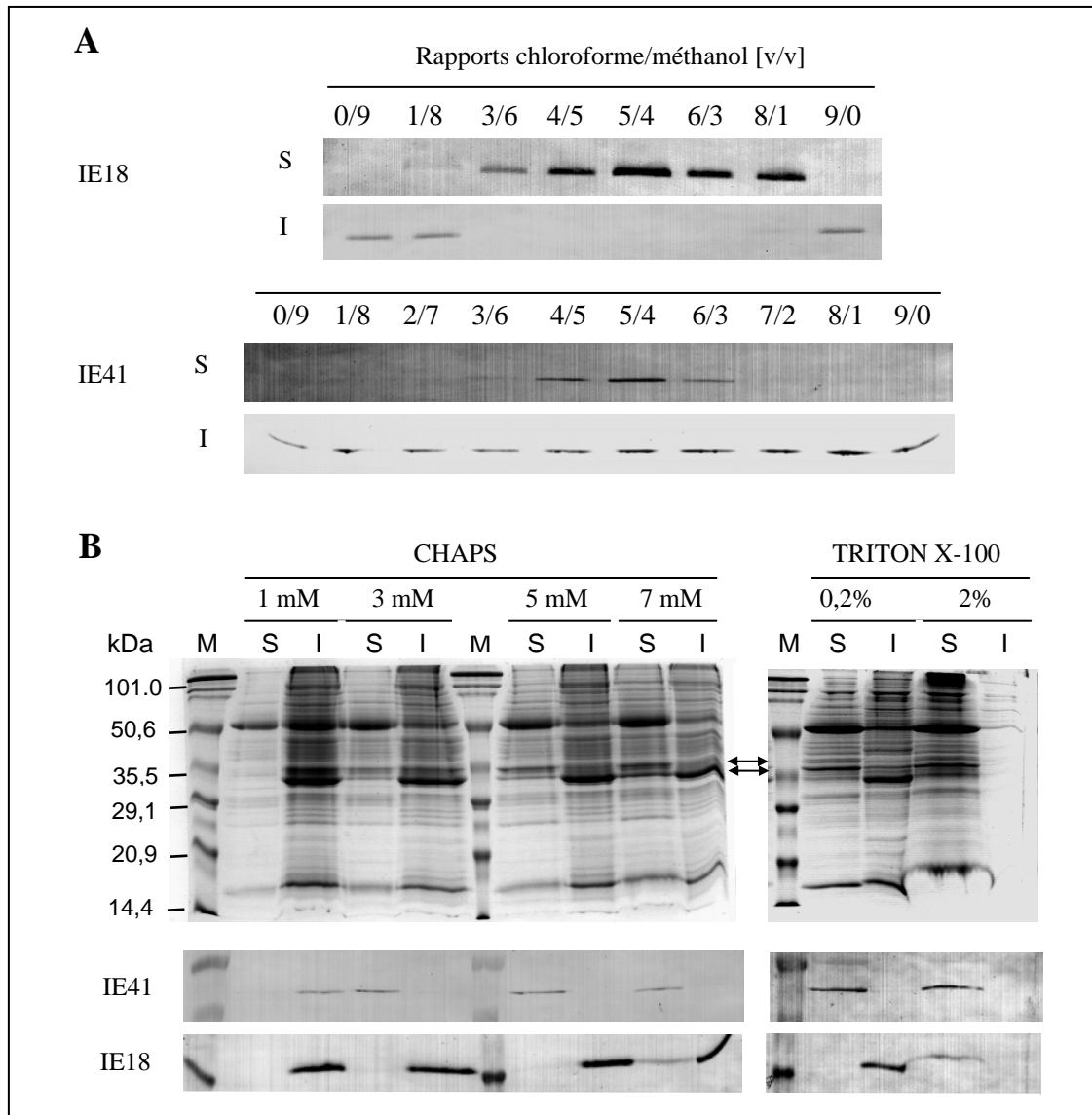
## C. Conclusion

L'ensemble des analyses réalisées tant avec les solvants organiques que des détergents suggère que IE41 présente une hydrophobicité modérée, comme IE37. Par contre IE18 est très hydrophobe, comme IE30. Ces résultats montrent donc qu'il est possible d'extraire de façon différentielle des protéines membranaires dans les solvants organiques en fonction de leur hydrophobicité.

Cependant, le rendement de l'extraction par les solvants organiques est variable. Si les mélanges de solvants organiques utilisés permettent une extraction très efficace des protéines



très hydrophobes (le rendement est proche de 100 %), il est très probable que seule une petite fraction des protéines les moins hydrophobes n'est extraite par des mélanges dans lesquels le rapport chloroforme/méthanol est voisin de 1. Ces protéines correspondent à celles pour lesquelles la valeur du rapport entre le nombre de résidus et le nombre possible d'hélices transmembranaires est élevé (supérieur à 100 environ, voir tableau VIII)



**Figure 20. Analyses comparatives des extractions différentielles dans les solvants organiques et des solubilisations dans les détergents. A.** Impact des rapports chloroforme/méthanol sur l'extraction des protéines IE18 et IE41 de l'enveloppe du chloroplaste. Les protéines de l'enveloppe sont extraites dans des mélanges chloroforme/méthanol de 0/9 à 9/0 [v/v], puis les protéines solubles (S) et insolubles (I) dans la phase organique sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes et analysées par marquage immunologique. Les immunodétections ont été réalisées avec les anticorps dirigés contre les peptides synthétiques de IE18 et IE41. **B.** Analyses par électrophorèse en conditions dénaturantes et immunodétection des protéines de l'enveloppe du chloroplaste solubilisées dans diverses concentrations de détergents. Les deux flèches indiquent la position de IE37 (haut) et IE30 (bas). Après solubilisation, les protéines insolubles (I) sont séparées des protéines solubles (S) par centrifugation. Les deux fractions sont analysées pour leur contenu en IE18 et IE41 par immunomarquage. M, marqueurs de masse moléculaire.

## VI. DISCUSSION - CONCLUSION

### **A. Le traitement des membranes de l'enveloppe des chloroplastes par des mélanges chloroforme/méthanol permet d'extraire les protéines intrinsèques les plus hydrophobes**

Nous avons développé une approche originale pour tenter de caractériser de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans des systèmes de transport à travers l'enveloppe. Cette stratégie repose sur l'hydrophobicité des transporteurs. La technique que nous avons utilisée permet l'extraction spécifique des protéines membranaires hydrophobes, certaines d'entre elles étant des composants mineurs de l'enveloppe (figure 10). Au moins 20 protéines différentes semblent être extraites par ces mélanges, et toutes celles que nous avons identifiées sont hydrophobes. L'utilisation de différents rapports de chloroforme/méthanol permet d'extraire de façon différentielle les protéines en fonction de leur hydrophobicité (figure 20). Les protéines très hydrophobes (comme IE30 et OE10) sont extraites dans la plupart des mélanges chloroforme/méthanol et notamment dans les mélanges contenant un fort pourcentage de chloroforme. Cependant, des protéines moins hydrophobes comme IE37 peuvent aussi être extraites dans certains mélanges (figure 10B).

D'autre part, cette technique d'extraction permet d'enrichir très fortement les protéines hydrophobes mineures (probablement au moins d'un facteur 10). Cet enrichissement permet d'avoir accès aux analyses de microséquençage pour des protéines hydrophobes de l'enveloppe très faiblement représentées. Ces résultats montrent que les extractions des protéines de l'enveloppe à l'aide de mélanges chloroforme/méthanol :

- Éliminent les protéines membranaires périphériques et les contaminants solubles du stroma.
- Limitent la complexité du profil protéique et donc limitent la sélection pour les composants les plus hydrophiles lors de la séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes.
- Apportent un facteur de concentration supplémentaire qui permet le séquençage et l'identification de ces protéines intrinsèques rares.

### **B. L'extraction des protéines hydrophobes par le chloroforme/méthanol est bien adaptée au microséquençage des protéines**

Les approches protéomiques classiques reposent en général sur l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle. Si cette technique a fait très largement ses preuves pour l'analyse des protéines solubles (Görg *et al.*, 1998 ; Rabilloud *et al.*, 1998), nous avons vu plus haut qu'elle est peu adaptée à l'étude des protéines membranaires (voir pp. 69,70). De plus, une étude récente a montré que l'extraction des protéines hydrophobes dans des mélanges chloroforme/méthanol (1/1, [v/v]) suivie d'une séparation par électrophorèse bi-dimensionnelle ne permettait d'identifier que des protéines cytoplasmiques et périplasmiques faiblement hydrophobes (Molloy *et al.*, 1999). En revanche, l'extraction des protéines

hydrophobes peut être facilement combinée à l'utilisation de l'électrophorèse en une seule dimension qui permet de séparer les protéines les plus hydrophobes. Ces techniques présentent de nombreux avantages :

- De nombreux transporteurs de l'enveloppe, comme d'ailleurs la majorité des protéines que nous avons identifiées ont un point isoélectrique très basique (tableau VIII). L'électrophorèse en une seule dimension s'affranchit totalement de ce paramètre qui est par contre une contrainte importante dans la première dimension (électrofocalisation) des électrophorèses bidimensionnelles.
- Contrairement aux électrophorèses bidimensionnelles, il est possible d'utiliser des concentrations très importantes de SDS, ce qui permet une très bonne solubilisation des protéines hydrophobes.

Les inconvénients liés à l'utilisation de l'électrophorèse monodimensionnelle sont très largement compensés par le développement récent de la technique de MS/MS pour le microséquençage des protéines. En effet, il est désormais possible de discriminer plusieurs protéines présentes au sein d'une même bande colorée au bleu de Coomassie. De plus, cette technique est beaucoup plus sensible (gain d'un facteur 10 à 100 par rapport aux techniques classiques de microséquençage). Nous avons pu ainsi déterminer des séquences très minoritaires dans des bandes majeures (comme celles qui renferment IE30 ou IE37).

Par lui-même, le séquençage par MS/MS a permis de faire des progrès considérables pour l'analyse des protéines hydrophobes. En effet, le microséquençage utilisant la technique de la dégradation d'Edman était une étape très limitante dans l'analyse des protéines hydrophobes, car de nombreux peptides hydrophobes étaient perdus lors de l'étape de purification sur HPLC, même si les conditions avaient été optimisées.

Ainsi, en combinant l'efficacité d'une méthode classique pour l'analyse des protéines hydrophobes (l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes) et la puissance d'un outil très moderne (le microséquençage des protéines par spectrométrie MS/MS) nous sommes parvenus pour la première fois à obtenir de nombreuses séquences de protéines hydrophobes à partir d'un système membranaire. Il est ainsi possible d'analyser sur un même gel 1-D des protéines majeures comme IE30 et IE37 et des protéines comme IE16 et IE18 qui sont des protéines mineures, basiques et hydrophobes de l'enveloppe.

### **C. Une approche protéomique spécifique de la localisation subcellulaire**

Enfin, nous cherchons à identifier des protéines de l'enveloppe des chloroplastes. Les analyses d'extraits protéiques totaux ne permettront jamais de caractériser des protéines mineures d'un compartiment minoritaire. L'enveloppe ne représente qu'une fraction très faible (environ 1 %) des protéines de la cellule. L'intérêt de partir d'enveloppe isolée est que les protéines sont déjà fortement enrichies. De plus, la localisation subcellulaire des protéines nouvellement

identifiées est relativement aisée lorsque les fractions membranaires initialement utilisées sont pures. Enfin, lors des extractions dans les solvants organiques, seules les protéines hydrophobes sont sélectionnées et les contaminants hydrophiles ne sont pas retrouvés dans ces fractions. Toutes les protéines hydrophobes que nous avons identifiées dans ce travail sont localisées exclusivement dans l'enveloppe du chloroplaste. En revanche, des études par électrophorèse bidimensionnelle basées sur l'analyse de l'ensemble du protéome de la membrane plasmique montrent un grand nombre de protéines (essentiellement hydrophiles) ayant des localisations subcellulaires multiples (Santoni *et al.*, 1998). Dans le cas de la membrane plasmique, il n'est actuellement pas possible de déterminer si les protéines ainsi caractérisées sont effectivement des composants de ce système membranaire (protéines intrinsèques ou périphériques) ou si la diversité des localisations subcellulaires est due à la présence d'autres compartiments (cytosol, membranes diverses, etc..) dans le matériel de départ.

Dans le cas de l'enveloppe, nos résultats confirment des analyses biochimiques antérieures (Pineau *et al.*, 1979 ; Joyard *et al.*, 1982 ; Block *et al.*, 1983a) qui ont démontré que les membranes d'enveloppe préparées à partir de chloroplastes intacts et purifiés ne contiennent pas d'autres systèmes membranaires (thylacoïdes, réticulum endoplasmique, membranes mitochondriales ...), mais seulement quelques contaminants solubles provenant du stroma (comme les deux sous-unités de la Rubisco). Les protéines que nous avons identifiées dans les extraits chloroforme/méthanol sont toutes des protéines membranaires, mineures et hydrophobes de l'enveloppe du chloroplaste.

L'ensemble des résultats obtenus valide ainsi notre hypothèse initiale et l'approche choisie afin d'identifier des protéines hydrophobes, présentant donc un ou plusieurs domaines transmembranaires. Nous avons pu caractériser des protéines basiques, hydrophobes et rares présentes dans un compartiment membranaire spécifique et mineur, l'enveloppe des chloroplastes, grâce à une stratégie combinant :

- l'utilisation de fractions subcellulaires d'une grande pureté et bien caractérisées,
- l'extraction différentielle des protéines membranaires hydrophobes par des solvants organiques,
- la séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes,
- des techniques protéomiques particulièrement performantes (spectrométrie MS/MS).

Cet ensemble de techniques représente donc une approche expérimentale attractive pour la recherche protéomique membranaire. De plus, à moyen terme, l'obtention des séquences complètes du génome de plante permettra d'assigner directement un gène à un fragment peptidique séquencé, sans passer par de lourdes étapes de clonage encore imposées par la très faible représentation de ces composants mineurs dans les banques d'EST.

## CHAPITRE II

### VERS LA CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE IE16 ET IE18, PROTEINES HYDROPHOBES DE L'ENVELOPPE

L'approche protéomique subcellulaire que nous venons de décrire (chapitre I) nous a permis d'identifier de nouvelles protéines de l'enveloppe des chloroplastes, en particulier IE16 et IE18. Ces deux protéines sont hydrophobes et localisées dans la membrane interne de l'enveloppe. Leur fonction est inconnue, mais certaines caractéristiques (comme la présence de plusieurs domaines transmembranaires potentiels) en font des candidats potentiels pour être des transporteurs. Nous avons développé trois approches différentes pour tenter d'identifier la fonction de ces protéines :

- **La recherche d'homologies avec des protéines de fonctions connues.** Cette approche *in silico* peut donner une indication sur la fonction des protéines IE16 et IE18 et indiquer si elles peuvent correspondre à des systèmes de transport.

- **L'obtention et l'analyse de mutants de cyanobactéries et d'*Arabidopsis*.** L'analyse des phénotypes des mutants dans les conditions normales de croissance ou dans des conditions particulières permet d'obtenir des informations sur la fonction de la protéine dont le gène a été interrompu, et de confirmer une éventuelle compatibilité avec un système de transport. L'obtention de mutants d'*Arabidopsis* était une nouvelle approche développée au laboratoire. Ainsi, nous avons dû mettre au point les techniques de criblage par PCR de la banque d'insertion d'*Arabidopsis*.

- **L'expression fonctionnelle des protéines dans des systèmes hétérologues et des tests d'activité de transport.** La production des protéines permet d'obtenir des quantités suffisantes pour les analyses biochimiques. Les molécules testées pour les activités de transport sont déduites des informations obtenues par les deux premières approches. Le système d'expression cellules d'insecte/baculovirus, adapté aux protéines membranaires, n'existait pas au laboratoire. J'ai donc développé la culture de cellules d'insecte au laboratoire et la technique d'expression utilisant le baculovirus.

Ces trois approches sont complémentaires. En effet, l'identification d'un phénotype chez les mutants et/ou la présence d'homologues ayant des fonctions connues devraient permettre d'orienter les recherches pour caractériser biochimiquement les protéines produites en système hétérologue. En particulier, la fonction potentielle de ces protéines pourra être étudiée par électrophysiologie, et le choix des premières molécules testées dépendra des phénotypes des mutants correspondants. Il sera aussi possible d'utiliser des molécules radioactives, ce qui permettra de suivre les influx et les efflux d'ions ou de métabolites.

## I. RECHERCHE DE PROTEINES HOMOLOGUES AUX PROTEINES IE16 ET IE18

La recherche de protéines homologues à IE16 et IE18 a été effectuée en utilisant des programmes de bio-informatique accessibles sur Internet. Cette recherche se fait à partir des séquences primaires des protéines, et peut se révéler très intéressante si la fonction des homologues est caractérisée. De plus, l'identification d'homologues chez les cyanobactéries donne la possibilité d'interrompre un gène donné par recombinaison homologue dans cette espèce. La caractérisation du phénotype des mutants obtenus peut ensuite donner des indications sur la fonction de la protéine mutée.

Tout d'abord, à une exception près (voir pp. 78,79), nous n'avons pas trouvé d'EST de plantes correspondant aux séquences des protéines IE16 et IE18. Par contre, plusieurs protéines homologues ont été identifiées chez des bactéries, des cyanobactéries et des algues rouges. D'autre part, nous n'avons pas trouvé d'autres protéines de plantes présentant de très fortes homologies avec IE16 et IE18 (excepté p16-2 d'*Arabidopsis*, homologue de IE16-1). En revanche, certaines parties de protéines présentaient des homologies significatives avec les séquences de IE16 ou IE18.

### A. Les homologues de IE16

La protéine p16-2 d'*A. thaliana* est le seul homologue de la protéine IE16-1 que nous ayons pu identifier dans les plantes supérieures. Cette protéine est aussi hydrophobe, elle contient 2-3 hélices transmembranaires putatives (figure 22), mais contrairement à la protéine IE16-1 (pI = 9,7), elle a un point isoélectrique acide (pI = 4,9).

Les recherches d'homologies de séquences montrent que la protéine IE16-1 est d'origine procaryote. En effet, des séquences homologues ont été identifiées chez *Synechocystis* PCC6803 (*sll1737*), chez *Porphyra purpurea* (YCXM) et chez *Cyanidium caldarium* (YCF15) (figure 21). La figure 22 montre que ces protéines présentent toutes des domaines transmembranaires, et correspondent donc à des protéines hydrophobes. La fonction de ces protéines n'est pas connue mais elles présentent des homologies avec des transporteurs de phosphate de type procaryote et eucaryote.

D'autre part, la protéine IE16-1 présente des homologies avec certaines parties de protéines connues. Les plus significatives sont les suivantes :

- 30 % d'identité (47 % de similarité) sur 150 acides aminés avec les transporteurs de phosphate/triose phosphate de l'enveloppe de chloroplastes (maïs, épinard, pomme de terre).
- 23 % d'identité (47 % de similarité) sur 150 acides aminés avec le PSTC (système de transport du phosphate à haute affinité) d'*E. coli*.
- 25 % d'identité (43 % de similarité) sur 152 résidus avec le transporteur de sulfate (du plasmalemm) d'*Arabidopsis*.

- 24 % d'identité (43 % de similarité) sur 150 acides aminés avec TIC20 de pois (protéine pouvant être impliquée dans l'import des protéines).

IE16-1At	<b>MA--SLCLSLHQTLTNPLSAPRCRPLSLSFPGSSTFSIRPSSRRATALTT</b>	48
p16-2At	<b>MAIISQFFAPLPSTLTGTLTLTGRSFLPLNLDLDTQFPKPRLSRDRRAATLVLQ</b>	50
s111737	.....	
YCXM_Po	..... <b>M-IRLFT--FGIITMLVLVIARLAIQRAYKYITLNTNINT</b>	37
YCF15	..... <b>MRINLRFVNILFGTACIIIFGLVILISYKLYRYIPKRNNSNK</b>	41
IE16-1So	...S <b>ATTPATDRLISSISYFLPF</b> .....	
IE16-1At	<b>RASYTPATERVISIASYALPFFNSLQ-YGRFLFAQYPRLGLLFEP--I</b>	95
p16-2At	<b>SKGDDSDASDRIISAVCYFYPPFDGIQ-YGKFIIITQYQPFQILIQP--L</b>	97
s111737	<b>MASNSTADGKDRFFSALIYVIPLIDAFM-FGGFLQQFPVLQIIYLP--I</b>	47
YCXM_Po	<b>TESKTRLSI--RLVSIIPYYLPLFEGLNFGQYVLPDYPVGAIPLYKIL</b>	85
YCF15	<b>VYKEDYPSIMARAISCLIIYFLPLLEGIAQFGIVCIDHHSWIRII-YKNTL</b>	90
IE16-1At	<b>FPILNLYRSVPYASFVAFFGLYLGVVRNT---SFSRYVRFNAMQAVTLDV</b>	142
p16-2At	<b>FPAIRAFKSFPPNGFLIFITLYFVVVRNP---NFSRYVRFNTMQAIVLDV</b>	144
s111737	<b>MPLLQFYQFPFASFIIIFIVLFMAVVRNN---NISHFIRFNAMQAILIGI</b>	94
YCXM_Po	<b>LPMLIFYMNHAILGLVTFYALYYVLVRNKSPITVHQLVRFNSMQSILLFL</b>	135
YCF15	<b>AYIVVPYLESPLIGFCIFITLYLIFVRGI--IQISKFIKFHIVQALLLYL</b>	138
IE16-1At	<b>LLAV-PVLLTRILDPGQGGGFGMKAMMWGHTGVFVFSFMCVYGVVSSLL</b>	191
p16-2At	<b>LL-IFPDLLERSFNPRD--GFGLDVVMSLDSTVFLFLLVSLIYGFSACLF</b>	191
s111737	<b>LLSLFGLIVAYVIQPV--FGQGL-VTETLYNF AFLGALACGFFGIVQSVL</b>	141
YCXM_Po	<b>VGSLFGAIFR-AF-PIE-FRISF-IGLTVCNMMFWFIFLSTITYSIVKAIQ</b>	181
YCF15	<b>LDSVIGTVLT-SL-PLE-IGYSF-IGDRLADTLLLLITFMISIIYAGTDALK</b>	184
IE16-1So	<b>-KTPYIPFVADAQ-R.....</b>	
IE16-1At	<b>GKTPYIPFVADAAGRQL.....</b>	208
p16-2At	<b>GLTPRLPLVAEADRQVL.....</b>	209
s111737	<b>GRYAEIPTISDAAYSQVR-F..</b>	160
YCXM_Po	<b>GKYSNIPVISEAVRIQISGYNT</b>	203
YCF15	<b>GQYSNIPLISEAAKMQSKSTD.</b>	205

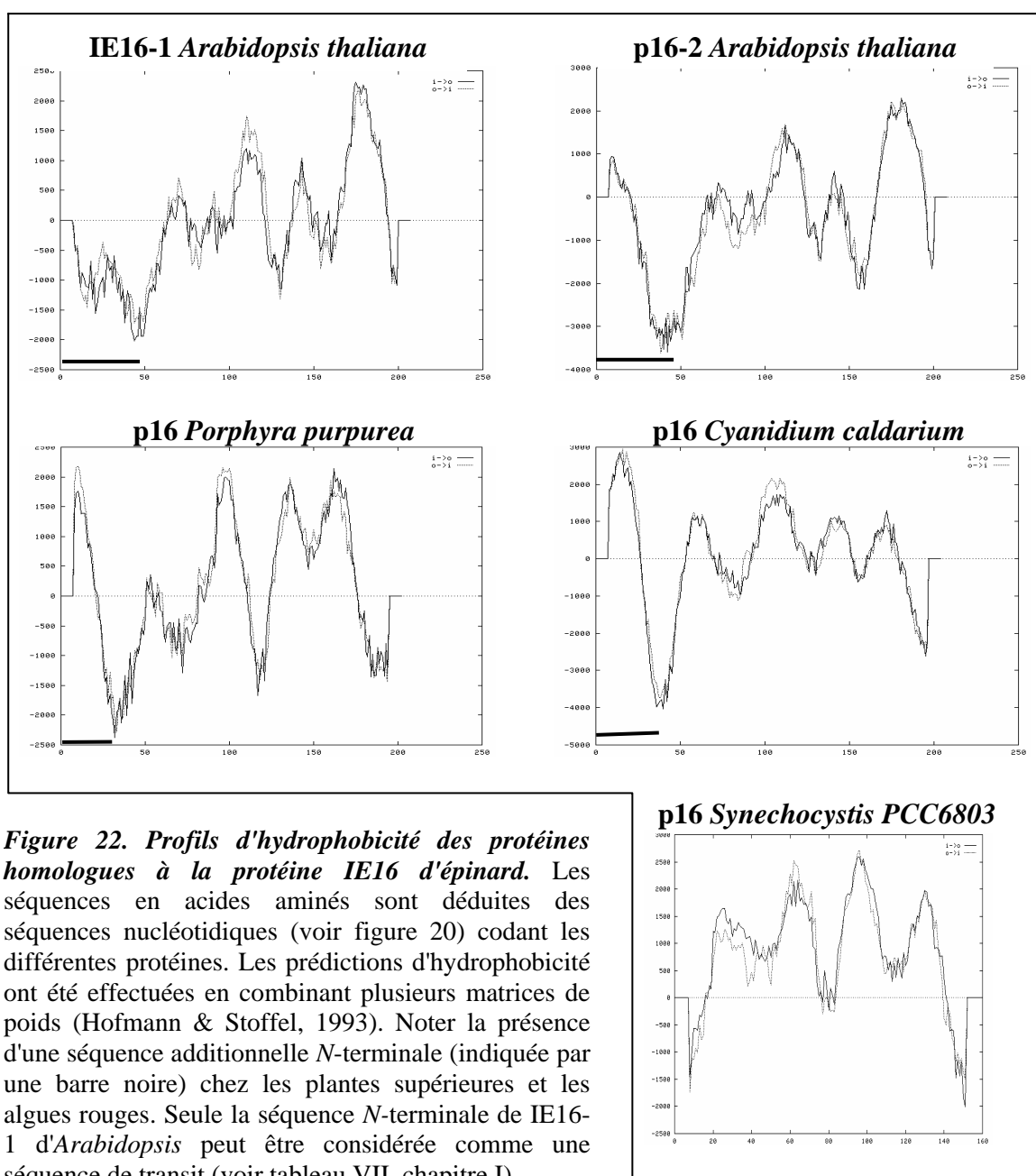
**Figure 21. Alignements des séquences primaires des protéines homologues de IE16.** Alignement des séquences obtenues à partir du microséquençage de la protéine IE16 d'épinard avec les séquences de la protéine correspondante d'*Arabidopsis thaliana* (IE16-1At) et de ses homologues. So, *Spinacia oleracea*. At, *Arabidopsis thaliana*. s111737, homologue de IE16-1 chez *Synechocystis* PCC6803 (62 % de similarité, 33 % d'identité sur 158 acides aminés). YCXM\_Po, homologue chez *Porphyra purpurea* (52 % de similarité et 28 % d'identité sur 160 acides aminés) et YCF15, homologue chez *Cyanidium caldarium* (47 % de similarité et 26 % d'identité sur 159 acides aminés). Les résidus en caractères gras correspondent à ceux identiques aux acides aminés de IE16-1At. Les résidus surlignés correspondent aux acides aminés similaires et identiques à ceux de IE16-1At.

## B. Les homologues de IE18

Deux homologues de la protéine de 18 kDa d'*Arabidopsis thaliana* ont été identifiés (figure 23), un chez *Synechocystis* PCC6803 (gène *slr0789*) et un autre chez *Pseudomonas stutzeri*

(ORF378). Ces protéines présentent aussi des homologies significatives avec des parties de protéines appartenant à des systèmes de transport de type procaryote :

- La protéine de plante présente 40 % d'identité (50 % de similarité) sur 65 résidus avec la protéine PTMA (mannitol perméase du système phosphotransférase ou PTS) de *Bacillus subtilis*, mais aussi certaines homologies avec des transporteurs d'acides aminés.
- La protéine de cyanobactérie présente 30 % d'identité (45 % de similarité) sur 122 acides aminés avec une "protéine de type canal potassique" de *Methanobacterium*. Elle présente aussi des homologies avec des perméases bactériennes diverses (proline, fer(III)-dicitrate...).



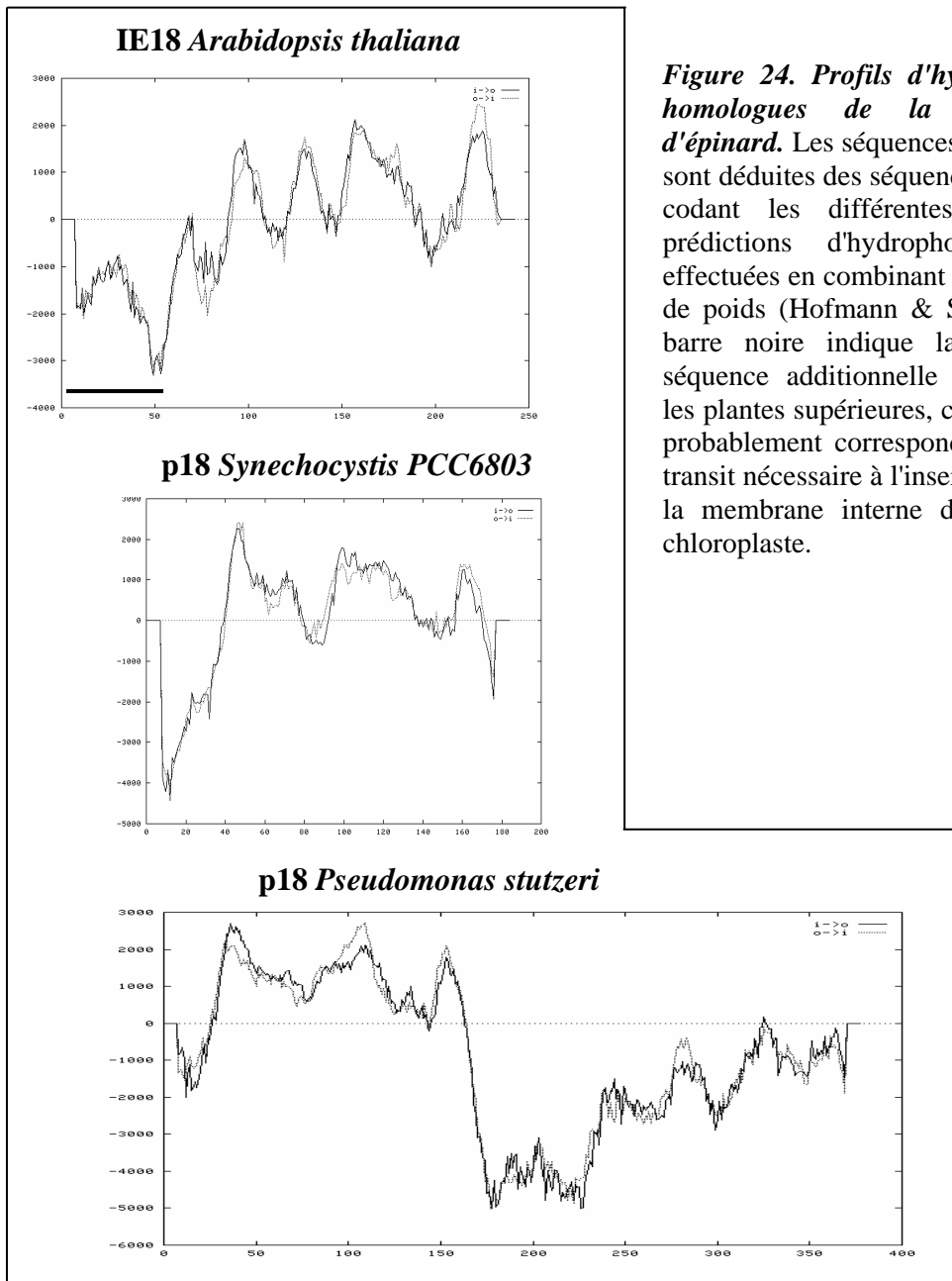
**Figure 22. Profils d'hydrophobicité des protéines homologues à la protéine IE16 d'épinard.** Les séquences en acides aminés sont déduites des séquences nucléotidiques (voir figure 20) codant les différentes protéines. Les prédictions d'hydrophobicité ont été effectuées en combinant plusieurs matrices de poids (Hofmann & Stoffel, 1993). Noter la présence d'une séquence additionnelle N-terminale (indiquée par une barre noire) chez les plantes supérieures et les algues rouges. Seule la séquence N-terminale de IE16-1 d'*Arabidopsis* peut être considérée comme une séquence de transit (voir tableau VII, chapitre I).



IE18So	.....MQIQCSKNLIFSPFLPPSKILNRKNIKQYVNLNSNSNGGSSGVL-FTSFPKRRR	52
IE18At	MASVVRPLPLLRNITSTTASKSSPMLANVSSRHSLSLGIYSTYDEFLLKQIKTPATVNHRRR	60
slr0789	.....MVDYRKAR	8
ORF378	.....	
IE18So	CFSTVIASSSTNVNAPLFDTWSPDKATPS---PSLSDVLWPSLGAFAGMAMLGKVDQL-L	108
IE18At	-VSTVVAS-AGNLTAPSWDSWKPKDTAAA-TALLLSDVIWPAAGAFAMALLGRMDQM-L	116
slr0789	-----LKWEDYWFKTLHRWRSCLPTCPVEKPHHGHI FWSWFGSFLAISICA----Y-L	56
ORF378	.....MHDNLI DWFRSFVPAFPNAPPKEW-LR--AAGGIAIVMLLTVFSGFWL	45
IE18So	APKGLS-MTIAPLGAVCAVLFITPKSPAARKYNMFMAQIGCAAIGVIAFTLLGPGWLSRG	167
IE18At	SPKGIS-MSVAPLGAVSAILFITPSAPAARKYNIFLAQIGCAAIGVVAFSVFGPGWLARS	175
slr0789	TVKTNSPLLMAFPGATSVLIFGVPSPLAQPRNVIGGNLLAALVSLTVLHFLGSSPMAMG	116
ORF 378	FGVPLTLQLVAPAGASAVLLFAASSSPFAQPWSVIGGNLLATVIGVSLGLTSLPSMVA	105
IE18So	ASLAASIAFMIIYTKSTHPPAASLPLL FIDGAKLHGLNYWYAL-FPGAAGCVLL---SLLQ	223
IE18At	VALAASIAFMVITRANHPPAASLPLMFIDGAKFHHLNFWYAL-FPGAACVIL-C--LLQ	231
slr0789	AAVSLAIGIMQFTGTTLHPPSGAVALVMM-TR-PDWNFILTP-TLEGSILLVL-C-AVVF	171
ORF 378	LCVCLVLVCLFSLRCLHPPGAALALVAVVGSPEIH-QLGYALLYPVAFNSLLLLAVALLY	164
IE18So	EIVYYLKENFK-F.....	235
IE18At	SIVCYLKENMK-F.....	243
slr0789	NNLAEERTYPKHWL.....	185
ORF 378	NNLT-RHPYPKPRLPRENLHHTSDPQPGERMSFSHDDVDRALREFGEYVDVTRDDLRLI	223
IE18So	.....	
IE18At	.....	
slr0789	.....	
ORF 378	KQTEKHALRRSMGEVTAADITSRDVYSHTPDTFIEQAWSTLQRNRLRSLPVVSDSRELVG	283
IE18So	.....	
IE18At	.....	
slr0789	.....	
ORF 378	IVTLVDLLKHFHPRPGRNLNFGQLKFLRGTKLRAIMSSPVVSVTADTHMVELVYLLSDRGL	343
IE18So	.....	
IE18At	.....	
slr0789	.....	
ORF 378	HCLPVVDAQRRLVGMITQTDLIAALYRNWLRHLPD	378

**Figure 23. Alignements des séquences primaires des protéines homologues de IE18.** Alignement des séquences polypeptidiques des protéines IE18 d'épinard et d'*Arabidopsis*, et des séquences de leurs homologues. So, *Spinacia oleracea*. At, *Arabidopsis thaliana*. slr0789, homologue de IE18 chez *Synechocystis* PCC6803 (59 % de similarité et 23 % d'identité sur 115 acides aminés). ORF 378, homologue chez *Pseudomonas stutzeri* (56 % de similarité et 28 % d'identité sur 119 acides aminés). Les résidus en caractères gras correspondent à ceux identiques aux acides aminés de IE18At. Les résidus surlignés correspondent aux acides aminés similaires et identiques à ceux de IE18At.

Les profils d'hydrophobicité obtenus pour l'homologue p18 de *Synechocystis* et la partie N-terminale de l'homologue de *Pseudomonas* (figure 24) montrent la présence de plusieurs domaines transmembranaires. La protéine de *Pseudomonas* possède une partie C-terminale supplémentaire par rapport à la protéine IE18 d'*Arabidopsis*. La protéine IE18 est d'origine procaryote puisque des homologues sont présents chez une bactérie et une cyanobactérie.

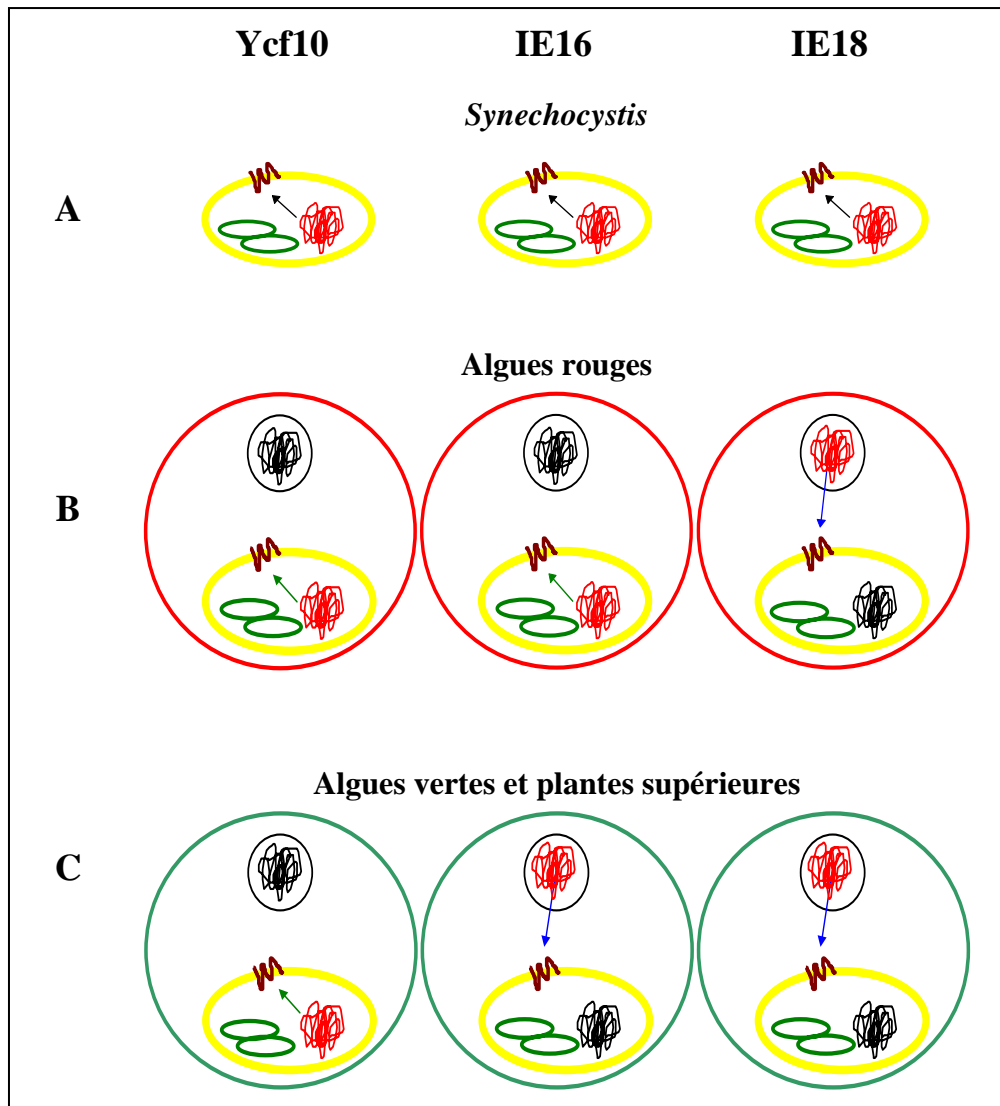


**Figure 24. Profils d'hydrophobicité des homologues de la protéine IE18 d'épinard.** Les séquences en acides aminés sont déduites des séquences nucléotidiques codant les différentes protéines. Les prédictions d'hydrophobicité ont été effectuées en combinant plusieurs matrices de poids (Hofmann & Stoffel, 1993). La barre noire indique la présence d'une séquence additionnelle N-terminale chez les plantes supérieures, cette séquence doit probablement correspondre au peptide de transit nécessaire à l'insertion de IE18 dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste.

### C. Conclusion

Les recherches d'homologies de séquences montrent la grande diversité de distribution des protéines homologues à IE16 et IE18. Ces protéines sont présentes chez les plantes supérieures ainsi que chez *Synechocystis*. En outre, un homologue de la protéine IE16-1 est présent chez des algues rouges. Enfin, il existe chez *Pseudomonas*, une protéine qui présente des homologies dans sa partie N-terminale avec la protéine IE18.

Si l'on exclut l'ORF de *Pseudomonas* homologue à IE18, toutes les protéines homologues à IE16 et IE18 sont présentes chez des organismes photosynthétiques. D'autre part, les caractéristiques de ces protéines (origine procaryote, hydrophobicité) sont en accord avec une localisation dans l'enveloppe du chloroplaste.



**Figure 25. Evolution de la localisation des gènes codant les protéines Ycf10, IE16 et IE18.** Le génome dans lequel se trouve le gène d'intérêt est représenté en rouge. Les protéines sont représentées en marron. Les ovales verts correspondent aux thylacoïdes, l'ovale jaune correspond au chloroplaste. Le noyau est représenté par l'ovale noir.

Ces résultats sont aussi intéressants au niveau évolutif, car ces deux protéines sont d'origine procaryote. Les gènes correspondants sont en effet présents dans le génome de la cyanobactérie *Synechocystis* (figure 25A). Au cours de l'évolution, la localisation des gènes *ie16* et *ie18* diverge. En effet, le gène *ie18* est absent des génomes chloroplastiques des algues rouges, des algues vertes et des plantes supérieures. Il a donc probablement été transféré dans le génome nucléaire dès l'apparition des cellules eucaryotes (figure 25B). La protéine correspondante doit donc être importée dans l'enveloppe du chloroplaste. En revanche, le gène *ie16* reste localisé dans le génome chloroplastique des algues rouges alors qu'il est présent dans le génome nucléaire chez les algues vertes ou les plantes supérieures. Enfin, on ne connaît actuellement qu'un seul exemple de protéine de l'enveloppe, la protéine Ycf10, qui soit codée par le génome chloroplastique (aussi bien chez les plantes supérieures, les algues

vertes que chez les algues rouges) et qui présente des homologues très proches chez les cyanobactéries (Rolland *et al.*, 1997). La figure 25 schématise ces 3 cas de figure.

La présence du gène *ie16* dans le génome chloroplastique des algues rouges est très intéressante. Sa localisation dans l'enveloppe des chloroplastes d'algues rouges est probable, mais demande à être confirmée. Si tel était le cas, ce serait, avec Ycf10, la deuxième protéine codée par le génome chloroplastique à être localisée dans l'enveloppe du chloroplaste.

Une autre observation intéressante est la présence probable, chez les homologues de IE16, d'une séquence additionnelle en *N*-terminal (voir figure 22). On l'observe aussi bien chez les plantes supérieures que les algues rouges alors qu'elle n'existe pas chez les cyanobactéries. Cette observation semble logique puisque chez les cyanobactéries l'adressage des protéines se fait dans la membrane plasmique par défaut. La présence d'une séquence de transit dans le précurseur de la protéine IE16 de plantes supérieures (et d'algues vertes) est tout aussi logique puisqu'elle permet l'import de la protéine, codée par le génome nucléaire, dans l'enveloppe. En revanche, l'existence potentielle d'une séquence additionnelle, en *N*-terminal, chez la protéine d'algues rouges homologue à IE16 est tout à fait surprenante si l'on considère que la protéine est codée par le génome chloroplastique. Cette possibilité ouvre de nombreuses perspectives quant à l'origine des séquences de transit nécessaires à l'adressage des protéines chloroplastiques. Des expériences sont envisagées pour confirmer cette hypothèse.

Enfin, nous avons vu que les protéines IE16 et IE18 présentent quelques homologies de séquences avec des systèmes de transport procaryotes. Cependant, ces homologies ne sont pas assez importantes pour orienter les études fonctionnelles des protéines IE16 et IE18. Ainsi, nous avons développé des approches de génétique inverse chez les cyanobactéries et chez *Arabidopsis*, l'objectif étant d'obtenir des informations pouvant orienter les analyses fonctionnelles ultérieures.

## **II. OBTENTION ET CARACTERISATION PARTIELLE DE MUTANTS DE CYANOBACTERIES ET D'ARABIDOPSIS THALIANA**

Une manière d'obtenir des indications sur la fonction de protéines inconnues est d'étudier le phénotype de mutants affectés dans l'expression de ces protéines. Dans l'espoir d'obtenir de telles informations fonctionnelles pour les protéines IE16 et IE18, nous avons cherché à obtenir des mutants affectés dans l'expression de ces protéines. Pour cela, nous avons d'une part muté les gènes codant les homologues de ces protéines chez *Synechocystis* et d'autre part recherché la présence de mutants d'insertion chez *Arabidopsis thaliana*.

### **A. Obtention de mutants de cyanobactéries**

Il est maintenant admis que les plastes ont une origine procaryote et qu'ils ont été intégrés dans l'ancêtre de la cellule eucaryote au cours d'une série d'évènements endosymbiotiques qui

sont à l'origine de la grande diversité des plastes des végétaux chlorophylliens (algues, plantes supérieures...). Les procaryotes impliqués dans ces événements endosymbiotiques ont une parenté étroite avec les cyanobactéries. Ainsi, la comparaison des génomes (position, séquence et expression des gènes) des eubactéries photosynthétiques et des plastes démontrent l'origine commune des plastes et des cyanobactéries. Par ailleurs, l'analyse des systèmes membranaires des plastes et des cyanobactéries apporte d'autres éléments convainquants en faveur de cette hypothèse. Ainsi diverses activités présentes dans l'enveloppe des chloroplastes sont proches de celles présentes dans le plasmalemme des cyanobactéries, de même leur composition chimique est très voisine (Joyard *et al.*, 1987).

Le fait que le génome d'une cyanobactérie, *Synechocystis* PCC6803, soit entièrement séquencé (Kaneko & Tabata, 1997), nous a conduit à tenter d'exploiter cette origine commune afin de comprendre la fonction des protéines de l'enveloppe. D'autres raisons ont guidé ce choix :

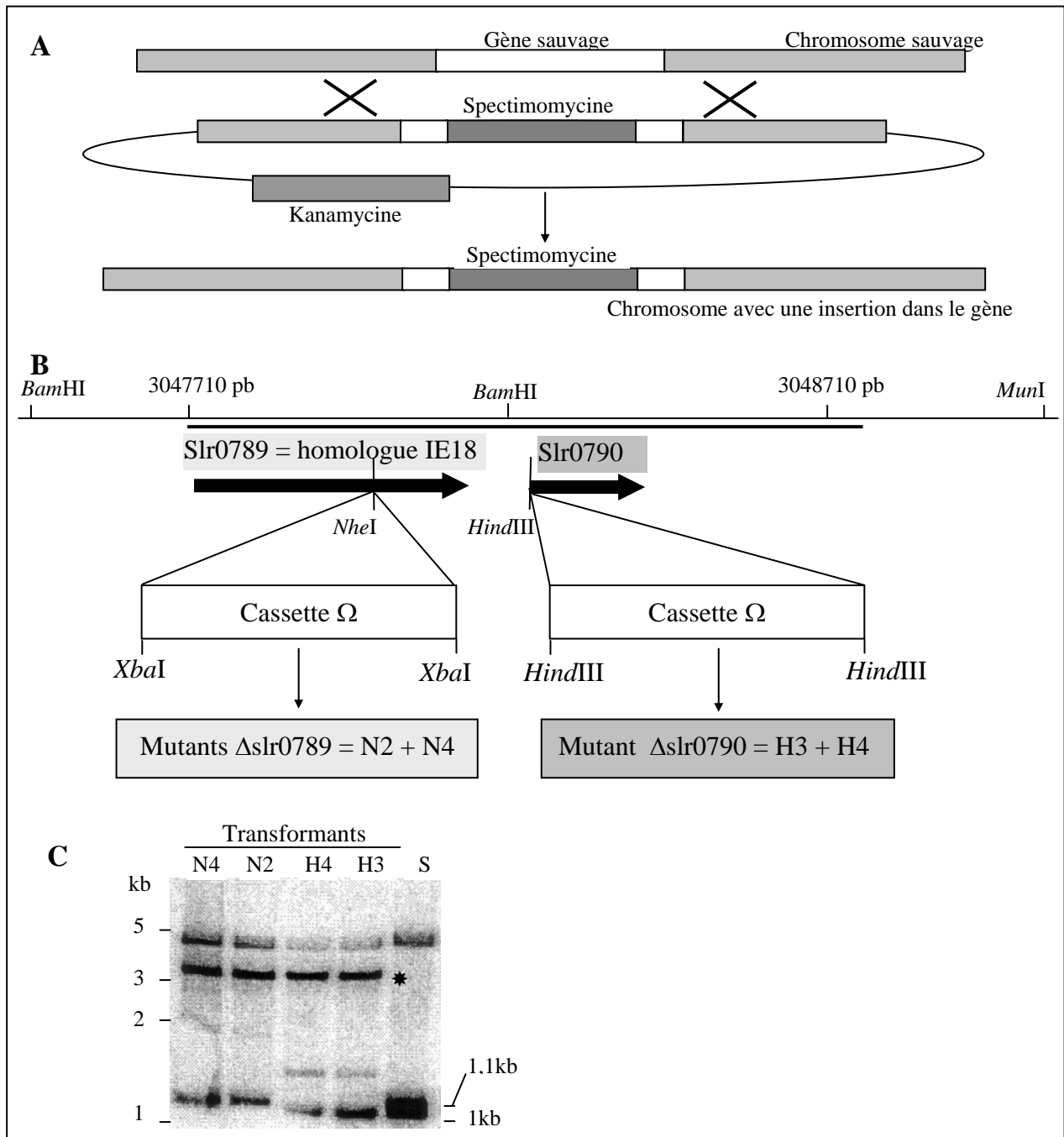
- Les cyanobactéries sont unicellulaires, ainsi le milieu de culture extérieur est facilement accessible par rapport au cytosol qui entoure le chloroplaste.
- Les cyanobactéries présentent les avantages d'un procaryote : leur culture est aisée, leur croissance rapide, elles n'ont pas de compartimentation cellulaire.
- Par ailleurs, *Synechocystis* est une souche dont la transformation est maîtrisée. Un mécanisme puissant de recombinaison homologue permet d'intégrer spécifiquement un gène étranger (cassette de résistance) au sein du gène cible (voir figure 26A).
- La fonction affectée dans un mutant est plus facilement identifiable du fait de l'aspect unicellulaire des cyanobactéries. De plus, il est très facile de modifier les conditions de culture et d'en observer les conséquences sur le phénotype des cyanobactéries.

### **1. Conditions de culture des cyanobactéries**

Les cultures de cyanobactéries sont réalisées sur boîte ou en suspension. Le milieu de culture utilisé est décrit dans l'annexe 1. Les milieux utilisés pour les cultures en boîte contiennent 1 % d'Agar. Les conditions de forte et faible lumière correspondent à des illuminations respectives de 30 et 10  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La croissance des cyanobactéries dans les cultures en suspension est déterminée par mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 580 nm.

### **2. Obtention de mutants de *Synechocystis* PCC6803 (Williams, 1988) - stratégie globale**

Les mutants ont été obtenus par insertion de la cassette  $\Omega$  (Prentki & Krisch, 1984 ; Williams, 1988) dans le gène *slr0789* (mutant N2) et dans le gène *slr0790* (mutant H4). Pour cela, le gène étudié est cloné dans un vecteur (pUC), puis la cassette  $\Omega$  est insérée dans la séquence du gène d'intérêt en utilisant un site de restriction unique. Dans la cyanobactérie, le plasmide contenant le gène avec la cassette peut s'insérer dans la séquence du gène par recombinaison homologue. Les étapes de transformations ont été réalisées par Ghada Ajlani.



**Figure 26. Obtention des mutants de cyanobactéries  $\Delta slr0789$  et  $\Delta slr0790$ .** A. Schéma représentant l'intégration d'un plasmide dans le chromosome bactérien par recombinaison double (d'après Thiel, 1994). Le plasmide contient le gène sauvage interrompu par une cassette contenant le gène de résistance à la spectinomycine. Une double recombinaison permet l'intégration du gène interrompu à la place du gène sauvage dans le chromosome bactérien. Les mutants sont ensuite sélectionnés par résistance à la spectinomycine. B. Schéma représentant l'obtention des mutants  $\Delta slr0789$  et  $\Delta slr0790$ . Les gènes sont indiqués par les flèches pleines. Les deux mutants,  $\Delta slr0789$  et  $\Delta slr0790$ , sont obtenus respectivement par insertion de la cassette  $\Omega$  au niveau d'un site *Nhe*I et *Hind*III. La barre noire correspond à la sonde utilisée pour les hybridations. C. Analyse par Southern de l'ADN génomique des souches mutantes et sauvage. L'ADN génomique est digéré par les enzymes *Bam*HI et *Mun*I. Les hybridations sont réalisées avec une sonde contenant les deux gènes (fragment amplifié par PCR pour l'obtention des mutants). N4, N2 et H4, H3 : respectivement mutants  $\Delta slr0789$  et  $\Delta slr0790$  issus de plusieurs transformations. S : souche sauvage. L'étoile indique la position des fragments correspondant aux gènes *slr0789* et *slr0790* contenant une insertion de la cassette  $\Omega$ . Les fragments de taille voisine de 4 kb correspondent à des digestions partielles.

### 3. Obtention d'un mutant de la protéine de *Synechocystis* homologue de la protéine IE18

Le gène codant la protéine IE18 présente 23 % d'identité et 59 % de similarité (sur 115 acides aminés) avec le gène *slr0789* de *Synechocystis* PCC6803, dont la fonction est inconnue. Afin d'obtenir des indications sur la fonction de IE18, nous avons analysé le phénotype du mutant  $\Delta$ *slr0789* de *Synechocystis*. Etant donné que le gène *slr0789* est suivi 130 pb en aval par un autre gène, *slr0790*, ces deux gènes sont probablement cotranscrits. Dans ce cas, une mutation dans le gène en amont pourrait affecter la transcription du second gène. Il était donc important d'obtenir deux mutants, un pour le gène *slr0789* et un autre pour le gène *slr0790*. L'analyse simultanée du phénotype des deux mutants par rapport à la souche sauvage permet de distinguer la mutation responsable d'une variation phénotypique. Le gène *slr0790* présente 53 % d'identité avec la protéine Umuc, protéine impliquée dans la réparation de l'ADN chez les bactéries.

Nous ne sommes pas parvenus pour l'instant à obtenir un mutant du gène *slr1737* (homologue du gène *ie16-1*) de *Synechocystis*.

#### a. Obtention des mutants

Le fragment d'ADN contenant les deux gènes *slr0789* et *slr0790* a été obtenu par amplification PCR à partir d'ADN génomique de *Synechocystis* PCC6803. Les oligonucléotides utilisés en 5' et 3' sont respectivement : 5' ACTTCTCGAGTGTTCAGTCC TTCATGGTTG 3' et 5' CCGAGTTAATCTAGATCGTTCGCGG 3'. Le premier oligonucléotide contient un site de restriction *Xho*I et le deuxième un site *Xba*I. Le fragment amplifié (environ 1380 pb) est cloné dans un plasmide pBluescript(KS).

Les mutants sont obtenus par insertion de la cassette  $\Omega$  dans la région codante d'un gène donné. Cette cassette correspond à un fragment d'ADN de 2 kb contenant un gène de résistance aux antibiotiques (résistance à la spectinomycine). De part et d'autre de la cassette se trouvent des sites de clonage. Les mutants  $\Delta$ *slr0789* et  $\Delta$ *slr0790* ont été obtenus respectivement par clonage de la cassette  $\Omega$ , digérée par *Xba*I, dans le site *Nhe*I (site compatible avec *Xba*I) présent dans le gène *slr0789*, et par clonage de la cassette, digérée par *Hind*III, dans le site *Hind*III présent dans le gène *slr0790*. Les mutants de cyanobactéries sont ensuite obtenus par recombinaison homologue entre le gène sauvage et le gène altéré porté par le plasmide. La sélection des mutants se fait sur un milieu contenant de la spectinomycine. Les mutants  $\Delta$ *slr0789* et  $\Delta$ *slr0790* sont appelés respectivement N2 et H4 d'après les sites de restriction dans lesquels la cassette  $\Omega$  a été insérée (figure 26B).

La dernière étape consiste à analyser par Southern la présence de la cassette dans chacun des gènes. Pour cela, l'ADN des transformants sélectionnés sur spectinomycine est extrait, puis digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Mun*I. La digestion par ces deux enzymes de l'ADN provenant d'une souche sauvage donne deux fragments, un de 1 kb qui contient le

gène *slr0789* et un de 1,1 kb contenant le gène *slr0790*. L'ADN total des souches mutantes et sauvage, une fois digéré, est analysé par Southern avec une sonde spécifique des gènes. Cette sonde correspond au fragment d'ADN amplifié par PCR pour l'obtention des mutants.

La figure 26C montre la présence, dans la souche sauvage, de deux fragments de 1 et 1,1 kb qui correspondent respectivement aux gènes *slr0789* et *slr0790*. Le fragment de 1 kb disparaît pour les transformants N2 et N4 alors qu'un fragment de 3 kb est apparu. Le signal à 3 kb correspond au gène *slr0789* contenant en plus la cassette  $\Omega$  de 2 kb. Les transformants N2 et N4 (ou mutants  $\Delta$ *slr0789*) contiennent donc le gène *slr0789* interrompu par l'insertion de la cassette et le gène *slr0790* non muté. De même, l'analyse du marquage pour les transformants H4 et H3 montre la présence du gène *slr0789* non muté à 1 kb et la présence du gène *slr0790* contenant la cassette  $\Omega$  à 3,1 kb.

#### b. Analyse du phénotype des mutants

Les mutants N2 et H4 ne présentent pas de phénotypes apparents (par rapport à la souche sauvage) lorsqu'ils se développent dans les conditions normales de culture. Afin d'analyser leur phénotype, nous avons fait varier plusieurs paramètres de culture dont l'intensité lumineuse, la concentration en sels, le pH des milieux.

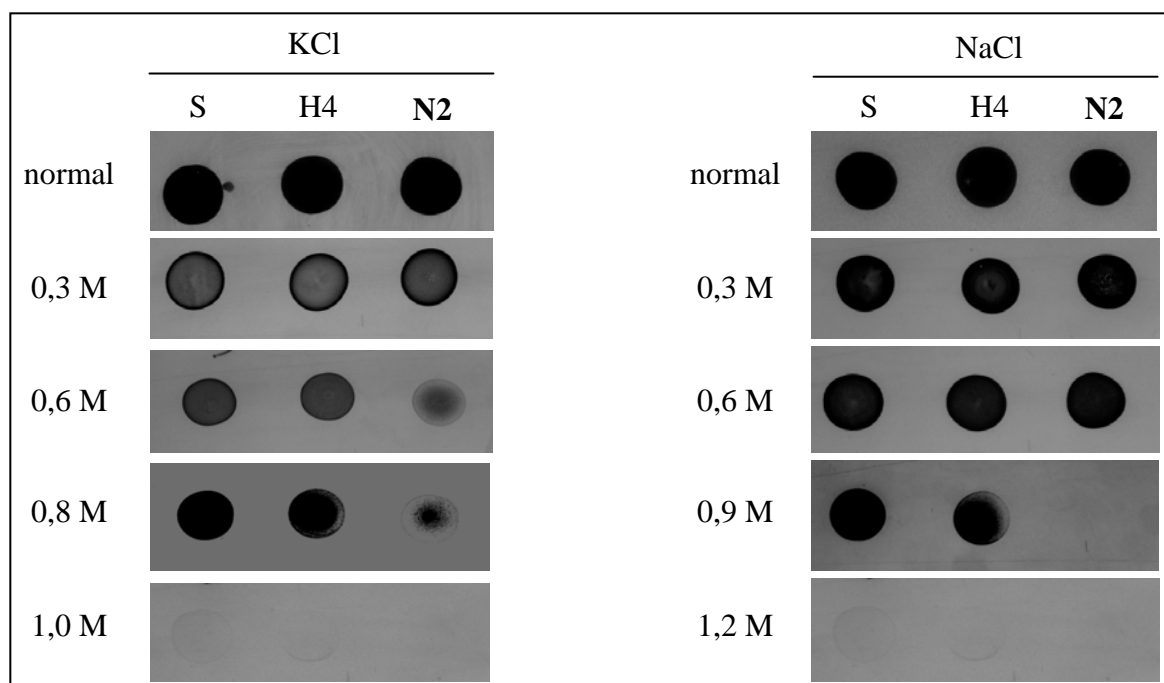
Nous avons tout d'abord étudié l'impact de fortes concentrations salines sur la croissance de ces différentes souches. Ces expériences ont été réalisées à partir de cultures sur milieu nutritif solide. La figure 27 montre que le mutant H4 (homologue de la protéine Umuc) présente le même phénotype que la souche sauvage. La croissance des deux souches (sauvage et mutant H4) n'est affectée que pour les concentrations salines de KCl 1 M et de NaCl 1,2 M. Dans les autres conditions, la croissance s'effectue normalement. En revanche, la croissance du mutant N2 est affectée pour des concentrations de KCl de 0,6 M, et est très faible pour une concentration de KCl de 0,8 M. De même, la présence de NaCl 0,8 M bloque la croissance de ce mutant (figure 27). Ces expériences montrent aussi que le mutant H4 (mutation dans le gène *slr0790*) présente les mêmes phénotypes que la souche sauvage. Ainsi, le phénotype observé pour le mutant N2 dépend seulement de la mutation du gène *slr0789*.

Des expériences complémentaires en milieu liquide sont en cours actuellement. Elles consistent à tester l'impact du pH et de fortes concentrations salines sur la croissance des souches sauvage et mutantes. Les résultats préliminaires montrent que le témoin et le mutant N2 ne poussent pas de la même manière à pH alcalin en présence de fortes concentrations salines.

#### c. Discussion

La régulation du pH cytoplasmique est essentielle à la croissance cellulaire et permet aux cellules de s'adapter aux changements de pH de l'environnement (Padan et al., 1981). Deux mécanismes sont donc nécessaires pour (a) augmenter le  $pH_{int}$  (lorsque le  $pH_{ext}$  est acide) et





**Figure 27. Impact de fortes concentrations salines sur la croissance des mutants de cyanobactéries N2 et H4.** La croissance des mutants par rapport à la souche sauvage est testée sur des milieux contenant des quantités croissantes de sels (KCl de 0 à 1 M, et NaCl de 0 à 1,2 M). Afin de comparer la croissance des différentes souches, la même quantité de cyanobactéries a été déposée pour chaque condition. S, souche sauvage. N2, mutant  $\Delta$ slr0789 homologue de IE18. H4, mutant  $\Delta$ slr0790.

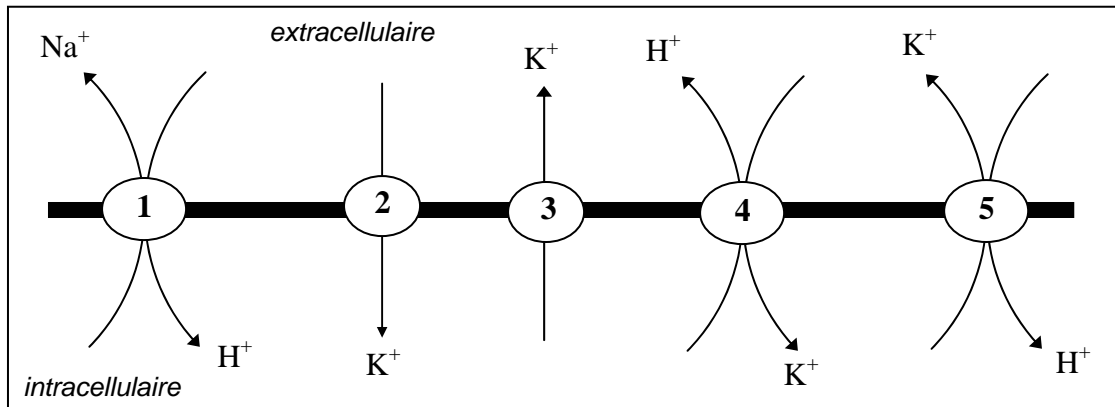
inversement (b) pour diminuer le  $pH_{int}$  (lorsque le  $pH_{ext}$  est alcalin) (Padan *et al.*, 1981). Les antiports  $Na^+/H^+$  et  $K^+/H^+$  jouent un rôle essentiel dans le maintien de la pression osmotique interne de la cellule et dans la régulation de pH. L'antiport  $Na^+/H^+$  permet :

- L'efflux de  $Na^+$  lorsque la concentration en  $Na^+$  interne est inférieure à la concentration externe.
- L'import de protons lorsque le pH extérieur est alcalin. Padan *et al.* (1989) ont montré que l'antiport  $Na^+/H^+$  est indispensable à une croissance des cellules en forte concentration saline et pour une croissance de la bactérie à pH alcalin.

L'antiport  $K^+/H^+$  permettrait au contraire un efflux de protons lorsque le pH extérieur est acide (figure 27) (Padan *et al.*, 1981). Cependant cette théorie est controversée. En effet, plusieurs études suggèrent qu'un antiport  $K^+/H^+$  permettrait l'influx de protons quand le pH cytosolique augmente (Plack & Rosen, 1980 ; Kroll & Booth, 1983). D'autre part, d'autres systèmes d'échangeur ou d'uniport sont probablement impliqués dans la régulation du pH et des concentrations en ions.

Suivant les phénotypes observés pour le mutant  $\Delta$ slr0789 (N2), différents systèmes de transport semblent être affectés. Les expériences réalisées sur milieu solide montrent que le mutant  $\Delta$ slr0789 ne pousse pas en présence de fortes concentrations de KCl et de NaCl. La sensibilité au KCl est plus importante. Le mutant semble donc être affecté dans un mécanisme permettant l'extrusion de ces cations afin de réguler l'osmolarité cytoplasmique. D'après le

modèle de Kroll & Booth (1983), l'antiport  $K^+/H^+$  ou le canal sortant  $K^+$  pourraient être affectés (figure 28, transporteurs 3 et 5).



**Figure 28.** Schéma représentant une partie des canaux ioniques qui pourraient intervenir dans la régulation du pH et de l'osmolarité.

1. Antiport  $Na^+/H^+$  (Padan *et al.*, 1981 ; Padan *et al.*, 1989) permettant l'import de  $H^+$
2. Uniport  $K^+$  entrant
3. Uniport  $K^+$  sortant
4. Antiport  $H^+/K^+$  (Padan *et al.*, 1981) permettant l'efflux de  $H^+$
5. Antiport  $H^+/K^+$  (Plack & Rosen, 1980 ; Kroll & Booth, 1983) permettant l'influx de  $H^+$

Dans l'état actuel de nos travaux sur la croissance des cyanobactéries en milieu liquide à différents pH, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Si la croissance du mutant est affectée à pH alcalin, ceci signifierait que le mutant ne peut plus réguler son pH cytoplasmique, et plus particulièrement l'acidification du cytosol. La mutation pourrait donc affecter l'antiport  $K^+/H^+$  (figure 28, transporteur 5), dans le cas où il est responsable de l'acidification du cytosol (théorie de Kroll & Booth, 1983).

Si, en présence de fortes concentrations salines la souche mutante est résistante à pH alcalin, on peut penser que le mutant est affecté dans un système d'import du  $K^+$  (figure 28, transporteurs 2 et 4), et plus particulièrement au niveau d'un canal entrant  $K^+$ . En effet, dans ce cas, la croissance du mutant n'est pas affectée par des variations de pH en absence de sels.

Ensemble, les expériences réalisées sur milieu solide et nos observations préliminaires réalisées en milieu liquide suggèrent que chez *Synechocystis* la mutation  $\Delta srl0789$  affecte probablement un système d'import ou d'export du  $K^+$ , ou un système échangeur  $K^+/H^+$ .

#### 4. Conclusion

Les protéines IE18 et IE16 présentent des homologues chez les cyanobactéries. Afin d'obtenir des informations sur la fonction de ces protéines, nous avons construit un mutant ( $\Delta srl0789$ ) du gène homologue à *ie18*. Le mutant pour la protéine homologue à IE16 n'a pas encore été obtenu. L'analyse des phénotypes du mutant  $\Delta srl0789$  dans certaines conditions de croissance suggère que le mutant pourrait être affecté dans un système de transport des cations et plus particulièrement de  $K^+$  et/ou de  $H^+$ .

Par analogie, il serait donc possible que la protéine IE18 puisse correspondre au canal entrant  $K^+$  identifié dans l'enveloppe (voir figure 2, n° 13), ou à un autre système de transport de cations non encore identifié. Elle pourrait ainsi intervenir dans la régulation des flux ioniques, du pH et de l'osmolarité.

## **B. Obtention de mutants d'*Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* est une plante modèle facilement utilisable en laboratoire pour les raisons suivantes : sa petite taille permet d'ensemencer un nombre important de graines (jusqu'à 1 000) dans une boîte de Pétri, c'est une plante autofécondable qui peut produire jusqu'à 10 000 graines par plant. Le cycle de reproduction est court, environ 8 semaines. De plus, *Arabidopsis* possède un petit génome (120 Mb) et peu de séquences répétées (Azpiroz-Leehan & Feldman, 1997).

### **1. Principe de la production de mutants d'insertion**

Les transposons ont été les premiers éléments mutagènes insertionnels utilisés pour l'obtention de mutants dans les plantes. *Arabidopsis* ne possédant pas de transposons actifs endogènes, une autre approche a été développée par différents laboratoires pour obtenir des mutants dans cette espèce. Cette approche consiste à intégrer un fragment appelé ADN-T. Ce fragment d'ADN provient du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*. Pour l'obtention des mutants, les gènes induisant les tumeurs dans ce plasmide ont été remplacés par des gènes de résistance aux antibiotiques et parfois des gènes marqueurs. Cet ADN-T modifié est ensuite transféré dans la cellule végétale par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* et va s'insérer dans le génome. Le locus interrompu par l'insertion de l'ADN-T est donc étiqueté. Ce système présente l'avantage d'introduire une insertion aléatoire de l'ADN-T et un faible nombre de copies. En effet, les ADN-T ont été retrouvés dans les introns et les exons, ainsi qu'au niveau des régions 3' et 5' de part et d'autre des gènes. Le nombre moyen d'insertion est de 1,5 par génome diploïde (Feldmann, 1991).

Les premiers transformants étaient obtenus par transformation à partir de feuilles, de tiges ou de racines, et ensuite par régénération de la plantule. Cette technique engendrait un fort taux de variants somaclonaux. Ainsi, une nouvelle approche a été développée par Feldmann & Marks (1987) qui consiste à transformer directement les graines. La collection de lignées transformées de l'INRA de Versailles que nous avons utilisée a été générée par infiltration sous vide de plantes sauvages adultes avec une suspension d'*Agrobacterium* (Bechtold *et al.*, 1993). Les plants sont ensuite cultivés jusqu'à maturité. Les plantes issues des graines produites (T1) lors de l'inflorescence contiennent des transformants avec un rendement important. Ces graines (T1) sont cultivées en serre et sélectionnées pour leur résistance au Basta (dont le gène de résistance est porté par l'ADN-T). Les graines T2 obtenues par autofécondation des plantes résistantes au Basta sont à nouveau semées et les plantes sont

sélectionnées pour leur résistance à la kanamycine (un autre marqueur de résistance porté par l'ADN-T). Seuls les transformants contenant ce gène de résistance pourront se développer. Les graines T3 sont obtenues après autofécondation de ces plants. Ces graines (T3) sont ensuite analysées pour déterminer le nombre d'inserts, et le phénotype des plants est étudié. L'ADN-T utilisé contient un gène de résistance à la kanamycine, le gène *nptIII*, et un gène rapporteur le gène *uidA* qui code la  $\beta$ -glucuronidase. Ce gène rapporteur n'est pas exprimé sauf s'il est intégré près du promoteur d'un gène chromosomique. Il est alors possible de suivre l'expression du gène muté en fournissant les substrats de l'enzyme à la plante.

Il est plus difficile d'atteindre la saturation d'un génome avec les ADN-T qu'avec des transposons. En revanche, la mutagenèse avec l'ADN-T résulte en un nombre d'insertions plus faible (1 à 2 loci par lignée), les insertions sont stables, faciles à maintenir et jusqu'à présent ne montrent pas de forts biais d'insertions (Azpiroz-Leehan & Feldmann, 1997). Sachant qu'il y a environ 1,5 insertions par génome diploïde, que le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 20 000 gènes, et que les gènes d'*Arabidopsis thaliana* ont une taille moyenne de 4 kb, 20 000 transformants contiennent *a priori* 30 000 insertions, ce qui correspond à une saturation de génome de 65 %. Par extrapolation, il faudrait 100 000 lignées transformées pour saturer totalement le génome (Bouchez & Höfte, 1998 ; Azpiroz-Leehan & Feldman, 1997).

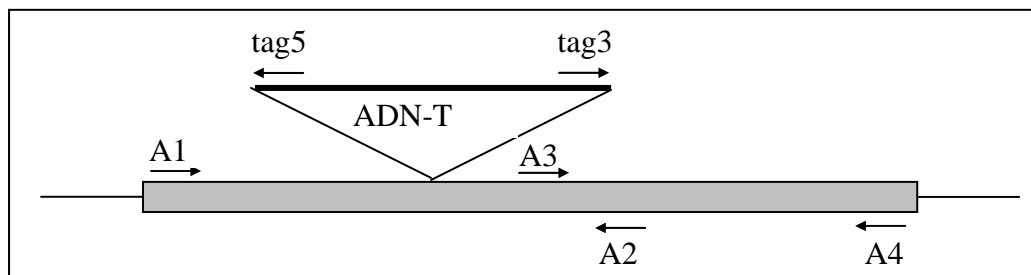
## 2. Criblage de la banque d'insertion

### a. Principe du criblage

La technique de criblage consiste à amplifier l'ADN génomique des transformants par PCR en utilisant des amorces spécifiques de l'ADN-T et des amorces spécifiques du gène (Bouchez & Höfte, 1998). Cette technique a été mise au point et utilisée avec succès par Ballinger & Benzer (1989), Kaiser & Goodwin (1990) pour identifier des mutations dues à des insertions de l'élément-P (transposon) chez la Drosophile. Nous avons utilisé cette approche sur 10 000 lignées transformées provenant de la banque d'insertion de l'INRA de Versailles.

Les lignées que nous avons criblées (en collaboration avec Daniel Salvi) sont organisées en pools et en superpools dans un tableau à deux dimensions afin de faciliter l'identification des mutants (ADN préparé par Frédéric Gaymard, CNRS/INRA, ENSA-Montpellier). Chaque pool comprend l'ADN issu de 100 plantes. Les pools A et B contiennent respectivement les lignées 1 à 100 pour A1, 101 à 200 pour A2...; 1, 101, 201, 301...9901 pour B1, 2, 102, 202...9902 pour B2 ... (voir annexe 5). Les pools sont ensuite regroupés en superpools. Un superpool comprend 5 pools donc l'ADN issu de 500 plantes. Les supers-pools A et B contiennent respectivement les pools A1 à A5 pour le superpool AI, A6 à A10 pour le superpool AII ..., et B1 à B5 pour le superpool BI, B6 à B10 pour le superpool BII... Il y a de 50 à 100 pg d'ADN génomique par plante étiquetée, soit environ au maximum 10 ng d'ADN total dans un pool et 50 ng d'ADN total dans un superpool.

La technique consiste donc à cribler par PCR les superpools. Les amplifications obtenues sont ensuite analysées par Southern avec une sonde spécifique du gène et une sonde spécifique de l'ADN-T. Si un fragment amplifié croise avec les deux sondes, il est alors séquencé pour vérifier s'il correspond bien au gène recherché contenant l'ADN-T. La même analyse est alors réalisée sur les pools contenus dans le superpool identifié. Ceci doit être réalisé pour les superpools et pools A et B afin d'obtenir à la fin une seule plante. L'orientation de l'insertion de l'ADN-T n'étant pas connue et le gène recherché étant plus ou moins grand, il est nécessaire d'utiliser plusieurs couples d'amorces, ce qui multiplie le nombre de PCR à réaliser. La figure 29 montre les différentes amorces possibles sur l'ADN-T et sur le gène recherché.



**Figure 29. Positions des différentes amorces utilisées pour le criblage par PCR.** Les amorces spécifiques du gène sont placées tous les 1 à 1,5 kb, et dans chaque orientation. Tag5 et tag3 sont les amorces correspondant respectivement aux séquences des bords gauche et droit de l'ADN-T.

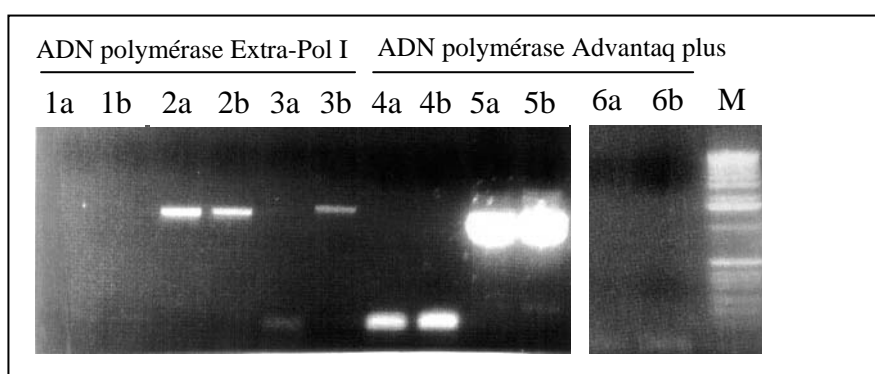
### b. Choix des amorces

Les amorces sont choisies dans des régions de forte complexité. Il est préférable d'avoir un pourcentage de G/C de 40 à 50 % au maximum, donc de choisir des régions moins riches en G/C. Les régions répétées et inversées (formation de boucles) sont à éviter, ainsi que les régions contenant une répétition du même nucléotide. En général, les amorces ont une taille de 24 ou 25 bases et une température de fusion ( $T_m$ ) comprise entre 60°C et 65°C. Plusieurs amorces gène-spécifiques sont choisies tous les 1 à 1,5 kb, ce qui évite l'amplification de fragments d'ADN trop grands selon l'insertion de l'ADN-T. Il est ensuite indispensable d'analyser les différents couples d'amorces spécifiques du gène. Ceci est réalisé sur de l'ADN génomique d'une lignée sauvage sur 20 et 200 pg d'ADN. La figure 30 montre les résultats obtenus pour les combinaisons d'amorces spécifiques du gène *ie18*.

Trois combinaisons d'amorces (spécifiques du gène) ont été testées : les amorces 10 + 8, 150 + 8, 340 + 8. La figure 30 (1ab et 4ab) montre qu'aucune amplification n'est obtenue avec le couple d'amorce 10 + 8. Une amplification est obtenue avec le couple d'amorces 340 + 8 mais seulement sur 20 pg d'ADN et avec l'ADN polymérase Extra-Pol I. Ces deux premières combinaisons d'amorces ne peuvent donc pas être utilisées pour les contrôles positifs d'amplification. En revanche, le couple d'amorces 150 + 8 permet une amplification dans chaque cas testé (figure 30, 2ab et 5ab). C'est donc cette combinaison qui a été choisie comme contrôle positif lors des étapes de criblage ultérieures.

La figure 30 montre aussi qu'une combinaison d'amorces peut donner une forte amplification sur une quantité faible d'ADN et ne rien donner pour des quantités plus importantes. C'est un problème que nous avons rencontré (avec l'enzyme Extra-Pol I, Eurobio) lors du passage des superpools (100 pg d'ADN/plante) aux pools (500 pg d'ADN/plante). Des variations de quantités d'ADN sont aussi retrouvées entre les superpools A et B.

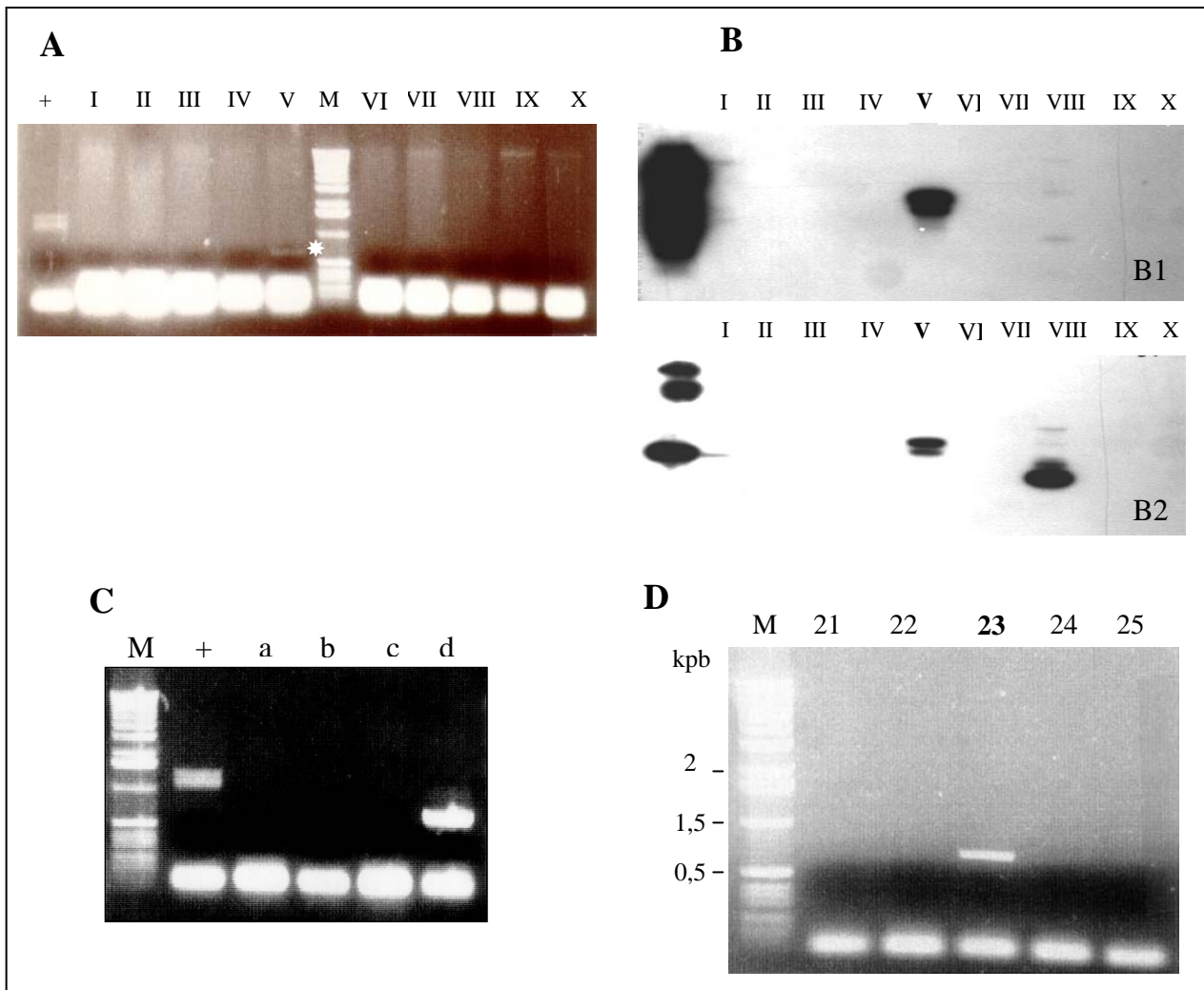
Il est important de choisir un couple d'amorces qui donne l'amplification la plus forte et sans bande artéfactuelle. Le choix de la polymérase utilisée pour les PCR est aussi important car selon les fournisseurs la sensibilité et le rendement sont très variables (figure 30).



**Figure 30. Test des couples d'amorces spécifiques du gène *ie18*.** Trois couples d'amorces sont testés sur deux quantités différentes d'ADN génomique de lignée sauvage d'*Arabidopsis thaliana*. a, 200 pg d'ADN. b, 20 pg d'ADN. 1 et 4, amorces 10 + 8 ; 2 et 5, amorces 150 + 8 ; 3 et 6, 340 + 8. La localisation de ces amorces sur le gène *ie18* et par rapport à l'insertion de l'ADN-T est montrée sur la figure 34. L'amorce 10 est située le plus loin de l'insertion et l'amorce 150 le plus près. Deux ADN polymérases différentes ont aussi été testées. De 1 à 3, enzyme commercialisée par Eurobio (ADN polymérase Extra-Pol I) ; de 4 à 6, enzyme commercialisée par Clontech (ADN polymérase Advantaq plus). M, marqueur de taille.

### 3. Criblage de la banque d'insertion pour l'identification de mutants du gène *ie18*

Les amorces spécifiques du gène *ie18* choisies pour le criblage et leurs positions par rapport au gène sont représentées sur la figure 34. Les superpools A ont été analysés par PCR en utilisant 4 combinaisons d'amorces comprenant les deux amorces spécifiques du gène et celles spécifiques de l'ADN-T. L'utilisation de ces différentes combinaisons est nécessaire puisque l'on ne connaît pas l'orientation de l'ADN-T. Les produits des amplifications sont ensuite analysés sur gel. Le gel obtenu pour l'analyse des superpools AI à AX avec une des combinaisons est présenté sur la figure 31A. Plusieurs fragments peuvent être obtenus. Afin de vérifier s'ils correspondent bien à un fragment du gène contenant l'insertion, une analyse par Southern est réalisée en utilisant une sonde spécifique de l'étiquette et une autre spécifique du gène. Cette analyse est réalisée en mélangeant les réactions de PCR obtenues par les différentes combinaisons d'amorces pour un superpool.

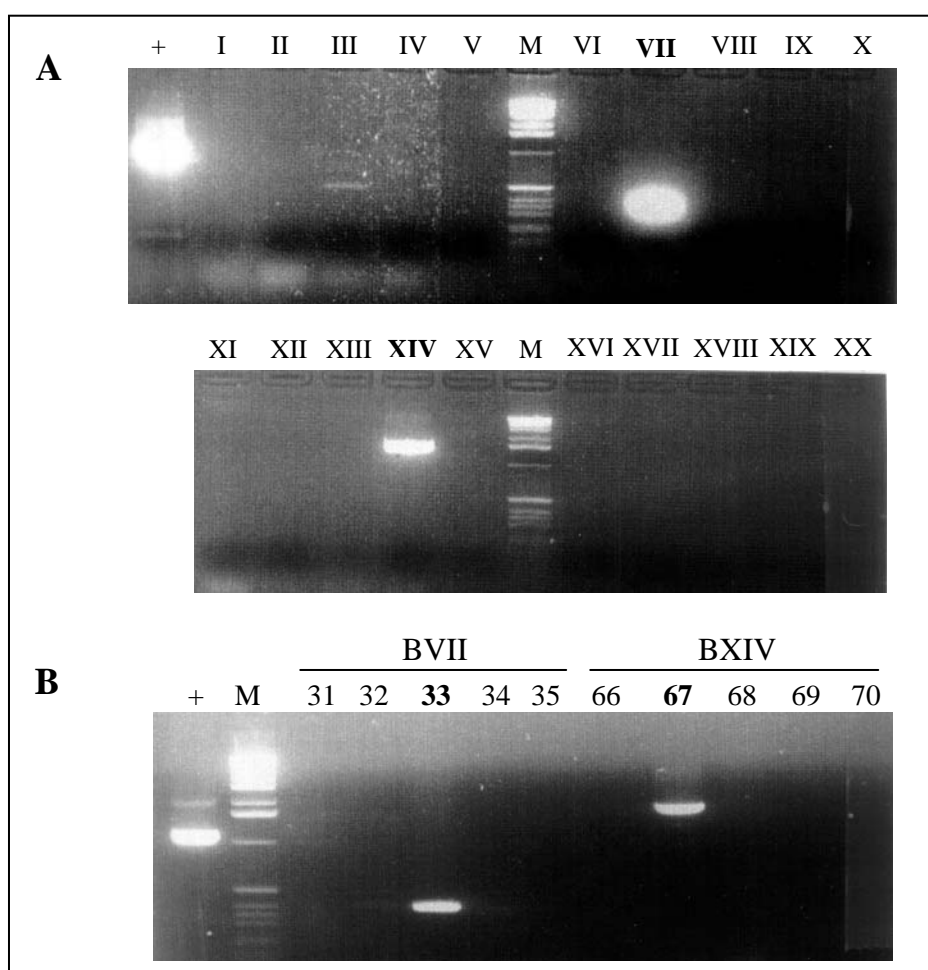


**Figure 31. Criblage des superpools et pools A pour l'identification de mutants du gène *ie18*** (Ne sont présentés que les résultats obtenus pour les superpools I à X). **A.** Amplification par PCR sur les superpools AI à AX avec le couple d'amorces 10 (amorcer spécifique du gène) et tag5 (amorcer de l'ADN-T). L'astérisque indique la bande amplifiée dans le superpool AV. +, contrôle positif pour la réaction de PCR. **B.** Identification du superpool A contenant un mutant du gène *ie18* par Southern sur les produits de PCR. L'hybridation est effectuée soit avec une sonde spécifique du gène (photo B1) soit avec une sonde spécifique de l'ADN-T (photo B2). Les réactions obtenues par PCR pour un superpool avec les 4 combinaisons d'amorces (8 + tag3, 8 + tag5, 10 + tag3, 10 + tag5) sont mélangées pour l'analyse par Southern. Seul le superpool AV contient un fragment d'ADN qui s'hybride avec les deux sondes. **C.** Détermination du couple d'amorces permettant l'identification du mutant. Une aliquote de chaque amplification par PCR sur le superpool AV est utilisé pour une réamplification avec le même couple d'amorce. a, 8 + tag3. b, 8 + tag5. c, 10 + tag3. d, 10 + tag5. +, contrôle positif. **D.** Identification du pool A contenant le mutant. Une amplification par PCR est réalisée sur les pools A21 à A25 en utilisant le couple d'amorces 10 + tag5. L'identité des fragments amplifiés est confirmée par séquençage (voir annexe 6).

La figure 31B montre que le fragment amplifié dans le superpool AV est révélé par les deux sondes. Le superpool AV contient donc l'ADN génomique d'une plante ayant une insertion de l'ADN-T dans le gène *ie18*. Afin de connaître la combinaison permettant l'amplification de ce fragment, une ré-amplification est effectuée sur une aliquote des amplifications obtenues pour chacune des combinaisons sur ce superpool. La figure 31C montre que la combinaison 10 +

tag5 (d sur la figure) correspond à celle qui permet la détection du fragment d'ADN. Le séquençage du fragment obtenu permet de confirmer sa nature et indique en plus la position de l'insertion de l'ADN-T.

L'analyse d'homologie de la séquence obtenue est présentée dans l'annexe 6. L'insertion se situe au niveau du premier intron du gène (figure 34). Le même couple d'amorces est ensuite utilisé pour cribler les pools A21 à A25 contenus dans le superpool AV. Un seul fragment d'environ 600 pb est obtenu dans le pool A23 (figure 31D). Le séquençage a confirmé l'identité du fragment. Pour chaque amplification par PCR, un contrôle positif est réalisé. Il consiste en une amplification sur 20 pg d'ADN issu de lignée sauvage avec les deux amorces spécifiques du gène.



**Figure 32. Criblage des superpools B et des pools B pour l'identification de mutants du gène *ie18*.**  
**A.** Amplification par PCR sur les superpools BI à BXX avec le couple d'amorces 150 (amorce spécifique du gène) et tag5 (amorce de l'ADN-T). Deux bandes sont amplifiées pour deux superpools, une vers 400 pb dans le superpool BVII, et une à 1,6 kb dans le superpool BXIV. +, contrôle positif pour la réaction de PCR. **B.** Détermination des pools B contenant les mutants du gène *ie18*. Les pools contenus dans les superpools BVII (B31 à B35) et BXIV (B66 à B70) sont criblés avec les amorces 150 + tag5. Deux mutants sont donc identifiés. L'identité des fragments amplifiés est confirmée par séquençage (voir annexe 6). +, contrôle positif. M, marqueurs de taille.

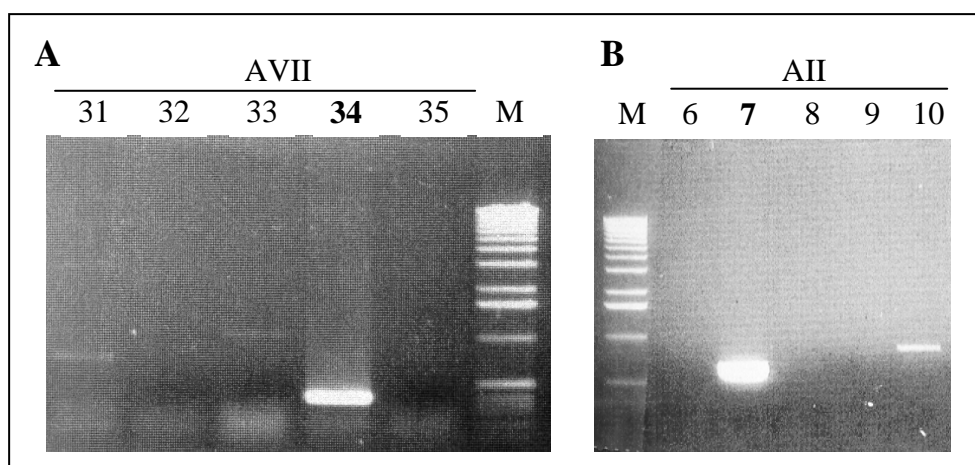


Le pool A23 contient donc un mutant du gène *ie18*. Cependant, ce pool contient 100 plantes différentes. Il est donc nécessaire de cribler les superpools et pools B afin de déterminer la plante d'intérêt. Le couple d'amorces 10 + tag5 ne permettant pas l'identification du superpool B, une autre amorce a été choisie et testée. Il s'agit de l'amorce 150, elle se situe plus près de l'insertion de l'ADN-T et permettra donc d'amplifier un fragment plus court.

Le criblage des superpools B avec la combinaison 150 + tag5 a permis l'amplification de deux fragments : un fragment de 400 bp dans le superpool BVII, et un fragment de 1,6 kb dans le superpool BXIV (figure 32A). Le séquençage de ces deux fragments montre que le fragment de 400 pb correspond au mutant avec l'insertion de l'ADN-T au niveau du 1<sup>er</sup> intron (mutant  $\Delta 18-1$ ). Le fragment de 1,6 kb correspond à un nouveau mutant (mutant  $\Delta 18-2$ ) dont l'insertion de l'ADN-T se situe dans le 2<sup>ème</sup> intron (figures 34 et 38). Les pools des superpools BVII et BXIV ont ensuite été criblés, la figure 32 montre que le pool B33 contient le mutant  $\Delta 18-1$ , et le pool B67 le mutant  $\Delta 18-2$ .

Afin d'identifier le superpool A contenant le mutant  $\Delta 18-2$ , un nouveau criblage des superpools A a été réalisé avec les amorces 150 + tag5. En plus du fragment déjà caractérisé dans le superpool AV, un deuxième fragment est amplifié dans le superpool AVII. Le séquençage de ce fragment montre qu'il correspond à une insertion de l'ADN-T au même site que le mutant  $\Delta 18-1$  localisé dans le superpool AV, ces deux superpools contiennent donc le même mutant. Le criblage des pools A correspondant au superpool AVII donne une amplification dans le pool A34 (figure 33A).

Le mutant  $\Delta 18-1$  est donc présent dans les pools A23, A34 et B33. Il correspond donc aux plantes 2233 et 3333. D'après la banque de l'INRA de Versailles, ces plantes sont appelées CPB1 pour le mutant A34/B33, et ACE3 pour le mutant A23/B33.



**Figure 33. Criblage des pools A pour l'identification de mutants du gène *ie18*.** **A.** Identification du pool A contenant le mutant  $\Delta 18-1$ . Les pools A31 à A35 du superpool AVII sont criblés avec les amorces 150 + tag5. Une bande est amplifiée autour de 400 pb dans le pool A34. **B.** Identification du pool A contenant le mutant  $\Delta 18-2$ . Les pools A6 à A10 du superpool AII sont criblés avec les amorces 1440 + tag5. Une bande est amplifiée autour de 550 pb dans le pool A7. L'identité du fragment amplifié est confirmée par séquençage (voir annexe 6). M, marqueurs de taille.

A.

Mutants	Superpools A/B (et Pools A/B)	Couples d'amorces utilisés pour la PCR	Amorces utilisées pour les séquences	Taille de l'amplification
◆ (353)	SP AV (P A23 )	10 + Tag 5	10 + Tag 5	650 pb
ACE3 (A23/B33)	SP AVII (P A34)	150 + Tag 5	Tag 5	360 pb
ou CPB1 (A34/B33)	SP BVII (P B33)	150 + tag 5	Tag 5	360 pb
● (1765)	SP AII (P A7)	1440 + Tag 5	Tag 5	550 pb
ABH11	SP BXIV (P B67)	150 + Tag 5	Tag 5	1600 pb

B.

MASVPVRPLPLLRNITSTTASKSSPMLANVSSRHSLGISTYDEFKQIKTPATVNHRRR 60  
VSTVVASAGNLTAPSWDSWKPKDTAAATALLLSDVIWPAA◆GAFAMALLGRMDQMLSPKG 120  
ISMSVAPLGAVSAILFITPSAPAAR●KYNIFLAQIGCAAIGVVAFSVFGPGWLARSVALAA 180  
SIAFMVITRANHPPAASLPLMFIDGAKFHHLNFWYALFPGAAACVILCLLQSIVCYLKEN 240  
MKF 243

C.

taatacacatatttgcggtggtgtatataaataaaaaacatgcatacatgtatcatttgtc -120  
tgtctccttattggctaagaaaacagagagaatcggtatTTTTtagcctttgctaagatatt -60  
tgaatcaaaaaatcccacttttgagcggctcttatctttattctc cacctcaaaggaccatt **Amorce 10**  
tctcatggctctgttccgggtgagacctctacctctctctcgcgggaacatcacctcgac 60  
M A S V P V R P L P L L R R N I T S T  
gacggcttcgaaatcatctccaatgctcgcgaacgcttcgagcggcattctctcgggat 120  
T A S K S S P M L A N V S S R H S L G I  
ctctacgtatgatgaatTTTTgaagcaataaaaaactccggcaactgtgaaccaccggcg 180  
S T Y D E F L K Q I K T P A T V N H R R  
gcgagtaagtacggtggtggcgtcggcgggaaacttgacggcgccgctcgtgggattcgtg 240  
R V S T V V A S A G N L T A P S W D S W  
gaagcctgataagacggcggcggctacggctctTTTTgctgagtgacgtcatatggcctgc **Amorce 150**  
K P D K T A A A T A L L L S D V I W P A  
tgctggtagtcatttaaaaagaattactatTTTactaatttagtgatttaaga 360  
A  
tcacaatttaattagtagtTTTTTgtcaaatgctttgagatatataattcttttact◆aat 420  
gttttctcgcgctcaaaaattgattgctcaatcagaagaactacaagaggcgattaggg 480  
taaaaaaagaagagagaagaagtgcacaaaagaaaataaaattagaaaattaatggaca 540  
attataatattaatttaatttctgactgactaaaagatgagtagatagaaaaaatatggagag 600  
agtcagagagagaatgtgtctTTTTcttaaggccaaaaggctattcatatgaacctttacc 660  
gttcgaatttgaccaatTTTTattgtatTTTacttgaactagcttagcttagtatttgact 720  
ataaatggtgtgatttacaaaaaataatctaaaaaattagaatagaactctaaataatt 780  
tgataaaagatattaattacctcaaaagtatgaaaattagtttatgacataaatatattc 840  
aaagattaagtaactgttagttaaagttgaatatctgtatctaaaaaaaagagttaa 900  
ataatgaatcgtggcatgttagtatttgaatagtttgcaaattacctaatgatgggaa 960  
atatgcatgcaagtcaaaactcatttggctcgtgagagaatcttagtttgcgtttagtcaaa 1020  
ccctatgctgacagagagcttatattatttatttcaaggtttatagctgacttcatcc 1080  
tattattatgaaactatattcatctgtgtctcagctatagtttagttaattaattacccat 1140  
ctacggtttcaacttgatctgaatTTTtagcggaccatggtgtcatgtaatatatttggat 1200  
tcaatTTTgttataggtattgtatcttattcatatgtaactctTTTgttagagcctttac 1260  
aaaaaatgtgagtagtgataataccgTTTgtTTTgTTTcttaattgaatTTTgtTTTat 1320  
gagtaggagcgtTTTgCGGcaatggcattattgggaagaatggatcaaatgctatctccga 1380  
G A F A A M A L L G R M D Q M L S P  
aaggcaTTTcaatgtcagttgcaccacttggcg cagtctccgccattctTTTcatcaccc **Amorces 6 et 8**  
K G I S M S V A P L G A V S A I L F I T **et 1440**

cttctgctcctgctgctcgggtaaatcttttagttaaccggtttttccatataatagcggtc	1500
<b>P S A P A A R</b>	
taattatatttgcgggttaaacgcaaacgcttcattgtcttttctgtgagacaaaaaatgc	1560
aaataccaaaagttagtggtaggatttggatgggtgtgtaacaaacatagaggaattgaa	1620
taatcaaaagttagaaagttagtggtagaggagacattttcccactaagttctatatccat	1680
aagctagttgaagattttcttctaattttgttcttctgtgcttacacttttctatggaataa	1740
atctagaggtccactattttatcgttgat●tgatactttcatatatttggataatttagtca	1800
caacctatttcagccatcttctcatgttttagattggaaagagatgccatcacatcaagtt	1860
aaaatagaaacttgaagtacttagtaattggtaatttgtcatcgtatcagttatttaactg	1920
attaattgaggagtggttttgtgtttcttatattttcagaaaatacaatatatttttggc	1980
<b>K Y N I F L A</b>	
tcaaataagggttgtgctgctgagattgggggtggtagctttctcgtcttcggcccaggctggct	2040
<b>Q I G C A A I G V V A F S V F G P G W L</b>	
cgcccggagtgctgcccctcgccgcttccatcgcttttatggctcattactcgtgccaatca	2100
<b>A R S V A L A A S I A F M V I T R A N H</b>	
ccctcctggtaaatatttacttcttttaatttttaccgaaatcagaaattgttttcttga	2160
<b>P P</b>	
ttcaaagtttttgaactctttttcataaaatgatataatttcacatgttcgatttttgac	2220
attgttattataaaaaaggaaaaatgatgcaaataatatttttttttaaaaaacatctga	2280
cttagtgatttttagcccatattatttttaaggaaagatttgaatcaaaccaaaaagccca	2340
aaaagaaaccatttattcaccatgatctgaaaaatgtaataaataatctggccccgcg	2400
actttaggatataccttcataaaataacctgaaacttttgggtggagcagaaacgtcccctt	2460
tatatatactcttcacaattttctcagtcctctttaattaagaaagaaagtcaaatgcgat	2520
tttattattattatttgccttctcgtcaattaatttacatatatttgagagttgatattgat	2580
tattatctataattcactctgataaaaattacagcggcgagcttaccactaatgttcataga	2640
<b>A A S L P L M F I D</b>	
tggagcaaagttccatcacttgaatttctggtacgcattgttcccagggtgcagctgcttg	2700
<b>G A K F H H L N F W Y A L F P G A A A C</b>	
tgtcatcctctgccttctcgtgaagtttgaattctcaaaaacaataaaatcaagataat	2760
<b>V I L C L L</b>	
gtttaatggcgaatattttgggtataagatttaacgtgataattaagtactaatctgatt	2820
caaattgatttcttggcagcaatcgatcgtatgttacttgaaggaaaacatgaaattttg	2880
<b>Q S I V C Y L K E N M K F -</b>	
atgaatcaccaagcgcacatgtacgatcgaa●ttaatgatataataacatacatatcga	<b>Amorce 11(Pools A)</b>
tggaaatcttgtgaaaatatttggattcatatgtatacacttgatgaacgtatgtaaata	+120
ctaaataattattaagttcattcaatattatcgtggctctctcgcgattccttattatcat	<b>* poly-A</b>
tttcctaattcttacataaattaacagtttaacacctcatacaaaaggattatacgagttaa	+240
ttattttcgcctccataaaatttccaaaattacgtaacattgtgtctttgtgatatgcctgt	+300
aacaaaaatataatgatcaattgtgttttaagatggactgtttggcaaatgtttggac	+360
ggctgtcgtgggtgagcttgaatttccctaataaggggtatacggaaacctaatttgttcagg	+420
aaaatagagataataacttattttatttttgataaagaaacatactacttgacgaaaaaacg	+480
aaaacaaaaagaaacataactacttattttcattttcatttgtttttgtattcaacaaagt	+540
acgcaattgaattcacattcaccgtacgtatgagaaaacttagtctacgatatttttctg	+600
aatttatgtgaagaaaaaagctaaaaagaaaatcaaaatattttatcaacatcttactgc	+660
taacttatttatgactaatcaccttaataaaaaacctggtaaatatgcataaccctttta	+720
acctgattcgggttctactactgttaa●aaaattcagattccgggttgatagatgtaaatatg	<b>Amorce 7(Pools B)</b>

**Figure 34. Identification de mutants étiquetés du gène *ie18* d'*Arabidopsis*.** A. Identification des insertions de l'ADN-T dans le gène *ie18*. Pour chaque mutant, sont indiqués les superpools et les pools dans lesquels les mutants ont été identifiés, ainsi que les amorces qui ont permis cette identification et la taille du fragment amplifié. B. Position des insertions de l'ADN-T dans la protéine IE18. La position des ADN-T dans la séquence polypeptidique de la protéine est indiquée par un losange et par un cercle. C. Positions des insertions de l'ADN-T dans le gène *ie18*, indiquées par un losange et par un cercle. Les amorces utilisées correspondent aux acides nucléotidiques surlignés en gris. Les introns sont indiqués par les caractères en italiques. Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés. SP : superpool. P : pool.

Un nouveau criblage des superpools A a été réalisé en utilisant une autre amorce afin d'identifier le 2<sup>ème</sup> mutant. Les résultats montrent une amplification dans le superpool AII. Le fragment amplifié correspond au mutant  $\Delta 18-2$ . Le criblage des pools A6 à A10 donne une amplification dans le pool A7 (figure 33B). Le mutant  $\Delta 18-2$  est donc présent dans les pools A7 et B67, il correspond au mutant appelé ABH11 dans la banque de l'INRA de Versailles.

#### **4. Criblage de la banque d'insertion pour l'identification de mutants du gène *ie16-1***

La technique de criblage est identique à celle utilisée pour le criblage des mutants du gène *ie18*, ainsi seuls les principaux résultats sont mentionnés. Les amorces utilisées et leurs positions sur le gène sont indiquées sur la figure 35. Le criblage des superpools B et A avec le couple d'amorces 9 + tag3 a permis l'identification d'un mutant dans les superpools BVIII et AI. Le séquençage des fragments amplifiés montre que l'ADN-T est inséré dans la partie codante de la protéine (voir figures 35 et 38). Les pools A1 à A5, et B36 à B40 ont ensuite été criblés avec la même combinaison d'amorces. Le mutant  $\Delta 16-1$  a été identifié dans le pool B38 et le pool A5. Ce mutant correspond donc à la plante 438 appelée ABC9 dans la banque de l'INRA de Versailles. Un deuxième mutant a été obtenu en utilisant les amorces 9 et tag5 (figure 35). Ce mutant correspond à une insertion de l'ADN-T dans la partie 3' non codante du gène *ie16-1*. La position de l'insertion suggère qu'elle n'aura pas d'effet sur l'expression du gène *ie16-1*. Ce mutant a été identifié dans les superpools AXVIII et BIII et les pools A90 et B14. La plante correspondante est DIF6.

#### **5. Analyse du phénotype des mutants**

Le criblage de la banque d'insertion par PCR a permis d'identifier deux plantes ayant une insertion de l'ADN-T dans le gène *ie16-1* (ABC9 et DIF6) et deux plantes ayant une insertion de l'ADN-T dans le gène *ie18* (ABH11 et ACE3). L'étape suivante de ce travail consiste à obtenir des plantes homozygotes pour le gène altéré et à analyser leurs phénotypes. Les protocoles utilisés pour la culture des plants d'*Arabidopsis* sont décrits ci-dessous.

##### a. Culture des plants d'*Arabidopsis thaliana*

###### *α. Préparation des graines d'*Arabidopsis thaliana* et semis sur milieu nutritif solide*

Les graines (environ 10 mg) sont stérilisées par une incubation de 10 min dans 1 ml d'un mélange contenant 9 ml d'éthanol et 1 ml d'une solution A (1 comprimé de barychlore dans 40 ml d'eau distillée, Triton-X100 0,5 % [p/v]), puis rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont remises en suspension dans une solution d'agarose 0,3 % [p/v] pour obtenir une répartition homogène. Elles sont semées en conditions aseptiques une à une sur un milieu nutritif solide (2,21 g de base minérale de Murashige et Skoog, 2,5 g de saccharose dans 500 ml d'eau distillée et d'Agar 0,8 % [p/v]). Chaque boîte est entourée d'un film micropore qui ne laisse diffuser que les gaz (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>), puis placée à 4°C et à l'obscurité, pendant 4 jours. Ce traitement permet de synchroniser la germination des graines.

**A.**

Mutants	Superpools A/B (et Pools A/B)	Couples d'amorces utilisés pour les PCR	Amorces utilisées pour les séquences	Taille de l'amplification
◆ (109)	SP AI (P A5)	9 + Tag 3	Tag 3	535 pb
ABC9	SP BVIII (P B38)	9 + Tag 3	9	535 pb
● (+278)	SP AXVIII (P A90)	9 + Tag 5	9 + Tag 5	1200 pb
DIF6	SP BIII (P B14)	9 + Tag 5	Tag 5	1200 pb

**B.**

MASLCLSLHQTLTNPLSAPRCRPLSLSFPGSSTFSIR◆PSSRRATALTTRASYPPTPATERVISIASYALP 70  
 FFNSLQYGRFLFAQYPRLLGLLFEP I F P I L N L Y R S V P Y A S F V A F F G L Y L G V V R N T S F S R Y V R F N A M Q A V T L 140  
 DVLLAVPVLLTRILDPGQGGGFGMKAMMWGHTGVFVFSFMCFFVYGVVSSLLGKTPYIPFVADAAGRQL● 208

**C.**

gttggttcacgaag → **Amorce 9**

ccctctagtagcatatatagggccatttatatagctaagtccgcccattatggtgtagtag -120  
 tgtgcgcgggccaaattttagattcgaaaacggcagcggttgagctggtacttttttttg - 60  
 ctcttctgtcaacaaatcgacactgccgactaacagcgaaaatcccaaacaaaaaat 0  
 aaaagaatggcgctctctgtgaccttctctccaccaaacctaactaatccctgtcggt 60

M A S L C L S L H Q T L T N P L S A

cccagatgcagaccactcagcctctccttccccggatcctcaaccttctcgatcc◆gcccc 120  
 P R C R P L S L S F P G S S T F S I R P  
 tctagcagacgcgaaccgccttgacgacccgcgctcctacaccccgacgccggcgact 180  
 S S R R A T A L T T R A S Y T P T P A T  
 gagcgcgtgatttcgatagcgtcgtagcgcgctgcccgttcttcaattctctgcagtacggg 240  
 E R V I S I A S Y A L P F F N S L Q Y G  
 cggttcctggttcgcgagtagcaccagggctgggattgctggttcgagccaatcttcccaatc 300  
 R F L F A Q Y P R L G L L F E P I F P I  
 ctgaacctgtacagatcgggtgcccgtacgcgagcttctggtgattcttccgggctgtacctg 360  
 L N L Y R S V P Y A S F V A F F G L Y L  
 ggagtggtaggaacacgagtttcagtaggtacgtgaggttcaacgcgatgcaggcgggtg 420  
 G V V R N T S F S R Y V R F N A M Q A V  
 acgctggatgtgctcctggcgggttcgggtgctgctgacccgaataactggatccgggtcaa 480  
 T L D V L L A V P V L L T R I L D P G Q  
 ggaggcgggtttggaatgaaggcgatgatgtgggggcacacgggggttttctgtcttcagc 540  
 G G G F G M K A M M W G H T G V F V F S  
 tttatgtggtttgtgtatggagtcgtcagctccttactcggcaaaactccatacattcca 600  
 F M C F V Y G V V S S L L G K T P Y I P  
 tttgtcgtgatgccgcccggtagacaactctaaatccggccaatatctacctcactcagt 660  
 F V A D A A G R Q L -  
 gttcgggttttcgattctagaatcgggtattttctgggtttataagagagaccaaataatc 720  
 agtgttgtaattaaccattaccggttttaaaaaaataatttttggtatactcccaacat 780  
 ttgatttggcccaatatgaaagaacagatggtggggcctttaatgaagctatcattgact 840  
 gagtataatttacaatcgtcgggtgaaaaggtaactaaagtaaacggtaaaaaatgagcg 900  
 ccgtctatctt●accgcgcaatgaatgagaagtcaatttgggaaactgatcggagaaaaga 960  
 gggagagaggggtttctcagctgaaatcaaaatgggtattatcagatttcaaatcctgaat 1020  
 ccgacgaggatttgtaggtctactatatattatattatgtcttgcggttatctgcatcatca 1080  
 tcatcatcatcatcaccactccgagatcttcttcttcatcgcaaaaacctagtttcgat 1140  
 ttctccagaaggtggcattttgggtcacctgatcatcaccagcaatatcaaaagcctgga **Amorce 4**

**Figure 35. Identification de deux mutants étiquetés du gène *ie16-1* d'*Arabidopsis*.** **A.** Identification des insertions de l'ADN-T dans le gène *ie16-1*. Pour chaque mutant, sont indiqués les superpools et les pools dans lesquels les mutants ont été identifiés, ainsi que les amorces qui ont permis cette identification et la taille du fragment amplifié. **B.** Position des insertions de l'ADN-T dans la protéine IE16-1. Les deux positions de l'ADN-T dans la séquence polypeptidique de la protéine sont indiquées par un losange et par un cercle. **C.** Positions des insertions de l'ADN-T dans le gène *ie16-1*, indiquées par un losange et par un cercle. Les amorces utilisées correspondent aux acides nucléotidiques surlignés en gris. Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés. SP : superpool. P : pool.

*β. Culture en phytotron*

Les boîtes sont déposées dans un phytotron à la lumière (50 à 60  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La photopériode est fixée à 10 h de jour, la température est de 22°C et l'hygrométrie de 65 %. Après 15 jours de croissance en conditions aseptiques, les plantules sont transférées en sol (terre stérilisée avant utilisation). La culture se poursuit jusqu'à maturité des graines. Les graines récoltées sont séchées à l'air libre.

b. Obtention des plantes homozygotes pour le gène interrompu

Lorsque la plante est identifiée, le lot de graines correspondant est demandé au centre de l'INRA de Versailles (lots fournis par Nicole Bechtold, INRA Versailles), les graines obtenues correspondent à la génération T3. Les graines sauvages et mutantes sont stérilisées puis semées sur milieu nutritif solide dans des boîtes de Pétri.

Il est nécessaire de semer un nombre important de graines afin d'être sûr d'obtenir des mutants homozygotes pour le gène altéré. En général, environ 20 graines sont semées par boîte et 3 boîtes sont préparées pour chaque souche.

Ces boîtes sont ensuite stockées 4 jours à l'obscurité, à 4°C ce qui permet de lever la dormance des graines et ainsi de synchroniser leur germination. La culture se poursuit ensuite dans un phytotron à 22°C, en présence de lumière. Après 2 à 3 semaines, les premières paires de feuilles de la rosette apparaissent et les plantules sont transférées en terre. Le développement de la plantule se poursuit. Lorsque les graines sont à maturité (graines T4), elles sont récoltées sur les diverses plantules.

La présence de l'insertion dans le gène d'intérêt (à l'état homozygote ou hétérozygote) a été analysée par PCR sur l'ADN génomique extrait à partir de chacune de ces plantules.

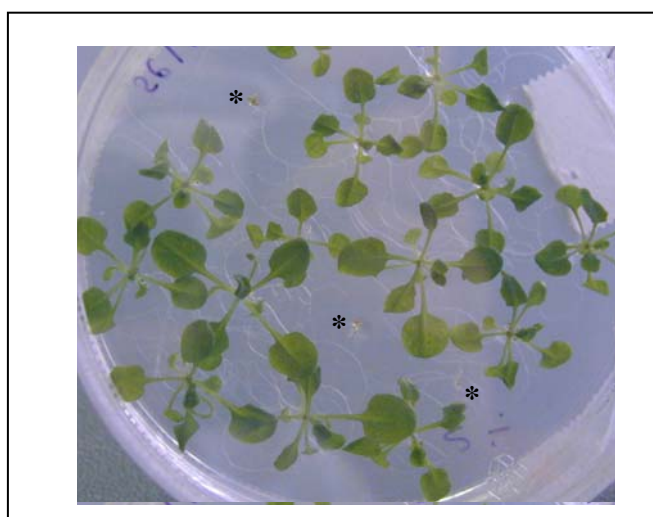
En parallèle, nous avons analysé la résistance à la Kanamycine (qui provient de l'ADN-T inséré dans le gène d'intérêt) dans la descendance de ces plantes. En effet, les plantes homozygotes pour le gène sauvage (appelé ici A) ne sont pas résistantes à la Kanamycine. En revanche les plantes homozygotes ou hétérozygotes pour le gène interrompu (appelé a) portent le gène de résistance à la Kanamycine qui provient de l'ADN-T inséré dans le gène d'intérêt. Le pourcentage de graines résistantes à la Kanamycine varie en fonction de la provenance des graines. Il est donc possible de sélectionner les lots homozygotes pour le gène muté (a) en semant chaque lot de graines (T4) sur milieu nutritif solide avec et sans Kanamycine. Les graines homozygotes pour le gène sauvage [AA] vont germer sur le milieu contenant la Kanamycine puis les plantes vont mourir au stade 2 cotylédons car elles ne possèdent pas le gène de résistance. Les graines provenant du lot homozygote pour le gène muté [aa] seront toutes résistantes, et celles provenant des lots hétérozygotes [Aa] auront ¼ des plantules non résistantes à la Kanamycine (dans le cas d'une ségrégation 3:1).

Les plantes homozygotes mutantes, identifiées sur la base des analyses PCR et de la résistance à la Kanamycine, devront alors être croisées avec une plante sauvage. La génération (F1) obtenue sera hétérozygote pour la mutation. Les plantes F1 seront alors autofécondées afin d'obtenir, dans la génération F2, des plantes homozygotes pour la mutation. Plusieurs croisements successifs seront essentiels pour éliminer d'éventuelles mutations parasites.

### c. Analyse des plantes mutantes

#### *α. Plantes mutantes pour le gène *ie16-1**

Le mutant ABC9 présente une ségrégation 3:1 pour la résistance à la Kanamycine. Les plantes homozygotes pour le gène muté n'ont pas encore été identifiées par PCR. Si l'on analyse la croissance des plantes provenant des graines T3, 25 % des plantules sont affectées dans leur croissance. En effet, les graines correspondant à ces plantules germent sur milieu nutritif solide, puis les premiers cotylédons apparaissent, deviennent rapidement blancs et la plantule meurt. Les racines de ces plantules sont très courtes.

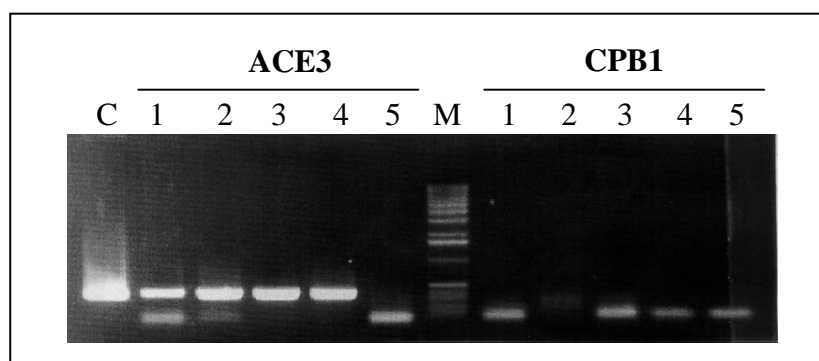


**Figure 36. Observation des phénotypes des plantules issues des graines T3 portant une mutation dans le gène *ie16-1* (mutant ABC9).** Les plantules présentant plusieurs paires de feuilles correspondent probablement aux plantes sauvages ou hétérozygotes pour le gène *ie16-1*. Les plantules dont les cotylédons sont devenus blancs sont indiquées par une étoile.

Il semblerait donc qu'une fonction essentielle au développement de la plante soit affectée dans ces plantules. Sachant que la résistance à la Kanamycine co-ségrège avec le phénotype observé (ségrégation 3:1), il est possible que les 25 % de plantules affectées correspondent aux mutants homozygotes pour le gène altéré *ie16-1*. Il sera important de démontrer que le phénotype observé est effectivement dû à l'insertion dans le gène d'intérêt. Pour les mutants DIF6, l'insertion de l'ADN-T dans la partie 3' non codante du gène *ie16-1* co-ségrège avec la résistance à la Kanamycine (ségrégation 3:1). Les mutants homozygotes pour l'insertion ne présentent pas de phénotypes particuliers dans les conditions normales de croissance.

*β. Mutation dans le gène codant IE18*

A l'issue du criblage par PCR de la banque d'insertion de l'INRA de Versailles, 2 lots de graines (CPB1 et ACE3) avaient été identifiés pour le mutant  $\Delta 18-1$ . Afin de déterminer le lot contenant réellement l'insertion de l'ADN-T, des analyses par PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique de plantules provenant des graines CPB1 et ACE3. Ces tests montrent que seules les plantes ACE3 contiennent une mutation dans le gène *ie18* (figure 37).



**Figure 37. Détermination des plantes contenant une insertion de l'ADN-T dans le gène *ie18*.** Les extractions d'ADN génomique ont été réalisées à partir de 5 plantes issues des graines ACE3 et CPB1. Les amorces tag5 et 150 (voir figure 34) ont été utilisées pour les amplifications par PCR. C : contrôle positif ; M : marqueurs de taille.

Les plantes ABH11 présentent une ségrégation 3:1 pour la résistance à la Kanamycine et les plantes ACE3 une ségrégation 15:1. Ces mutants ne présentent pas *a priori* de phénotypes particuliers dans les conditions normales de croissance.

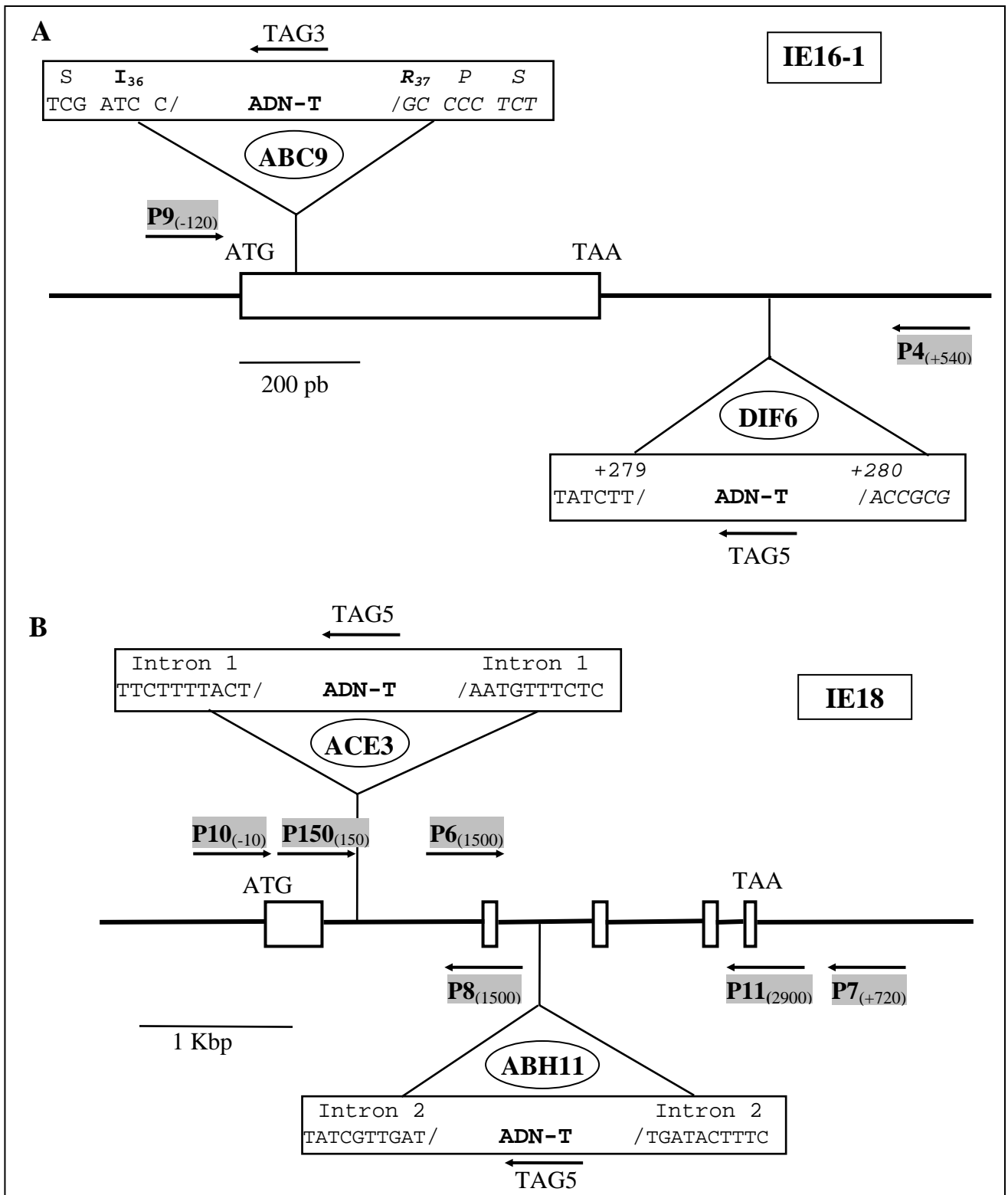
## 6. Conclusion

Le criblage par PCR de la banque d'insertion de l'INRA de Versailles a permis d'obtenir plusieurs mutants correspondant aux protéines étudiées.

Deux mutants ont été obtenus pour le gène *ie18*. Ils possèdent chacun une insertion différente de l'ADN-T dans le gène *ie18*. L'insertion du mutant  $\Delta 18-1$  (plantes ACE3) est localisée dans le premier intron du gène *ie18* (figure 38B). Le deuxième mutant du gène *ie18* (plantes ABH11) possède une insertion dans le deuxième intron du gène (figure 38B).

Dans les conditions normales de croissance, ces mutants ne présentent pas de phénotypes visibles. Sachant que le mutant du gène *ie18* de cyanobactérie semble être affecté dans les systèmes de flux de  $K^+$  et/ou de  $H^+$ , il sera intéressant de tester la croissance des mutants homozygotes d'*Arabidopsis* sur des milieux gélosés contenant de fortes concentrations salines. Des dosages d'ions  $K^+$  pourront aussi être effectués dans les feuilles de plantes sauvages et mutantes afin de savoir si les plantes mutantes, homozygotes pour le gène *ie18* altéré, ont un contenu en ion  $K^+$  modifié.





**Figure 38. Diagrammes schématiques indiquant les sites d'insertion de l'ADN-T et les séquences des jonctions gènes/ADN-T dans plusieurs mutants d'Arabidopsis.** Les séquences codantes des gènes sont indiquées par les rectangles gris. Les positions des insertions de l'ADN-T correspondent aux rectangles blancs dans lesquels sont notées les séquences nucléotidiques au niveau de la jonction avec la séquence de l'ADN-T. Les amorces spécifiques de chaque gène sont indiquées par la lettre P suivie du n° de l'amorce et sa position par rapport à la séquence du gène. Le sens de l'amplification est noté par la flèche en dessous. **A.** Mutants du gène *ie16-1*. **B.** Mutants du gène *ie18*. Les noms des plantes mutantes sont indiqués dans les cercles.

Le criblage de la banque d'insertion a permis l'identification de deux mutants pour le gène *ie16-1*. Le premier, qui correspond aux plantes ABC9, contient une insertion de l'ADN-T dans la séquence codante du gène (figure 38A). En revanche, l'insertion de l'ADN-T dans le second mutant est localisée en 3' du gène, dans la séquence non codante (figure 38A). La croissance de 25 % des plantes ABC9 est très affectée. En effet, après la formation des deux premiers cotylédons, la plantule devient blanche et meurt. Ces plantes peuvent correspondre aux mutants homozygotes pour le gène *ie16-1*, mais cela doit être confirmé. Il est intéressant de noter que les plantes DIF6 ne présentent pas de phénotypes particuliers. Si le phénotype observé chez les plantes ABC9 est effectivement corrélé à l'insertion dans le gène *ie16-1*, l'insertion de l'ADN-T dans le mutant DIF6 ne doit, *a priori*, pas affecter l'expression de la protéine IE16-1.

L'identification des plantes homozygotes (pour le gène altéré) et l'obtention de lots de graines correspondants sont en cours actuellement. Les phénotypes de ces mutants seront par la suite analysés dans des conditions particulières de croissance. Lors de ces essais, les premières conditions testées dépendront des informations apportées par les homologies de séquences ou par l'analyse des phénotypes des mutants de cyanobactéries. Notamment, l'effet de fortes concentrations salines sera analysé pour les plantes mutées dans le gène *ie18*. La protéine IE16-1 présente des homologies avec des transporteurs de phosphate. Ainsi des essais de culture sur du milieu nutritif solide complétement en phosphate seront réalisés. L'objectif est de trouver des conditions dans lesquelles la croissance du mutant ABC9 (mutation dans le gène *ie16-1*) est restaurée dans le cas où le phénotype observé est effectivement associé à l'insertion dans le gène *ie16-1*. Ces analyses de phénotypes en fonction des conditions de croissance pourront sans doute apporter des informations sur la (ou les) fonction(s) affectée(s) dans ces mutants. Ces informations seront ensuite utilisées pour orienter les analyses biochimiques qui seront effectuées sur les protéines recombinantes, exprimées dans des systèmes hétérologues.

### III. SUREXPRESSION DES PROTEINES DANS DES SYSTEMES HETEROLOGUES

Les protéines hydrophobes de l'enveloppe IE16 et IE18 sont très faiblement représentées dans l'enveloppe des chloroplastes. Leur caractérisation biochimique nécessite donc de les produire dans des systèmes d'expression hétérologues. Il est donc nécessaire au préalable de cloner les ADNc codant ces protéines, cette étape est décrite dans le chapitre I. Nous avons utilisé pour les surexpressions les ADNc codant les protéines IE16-1 et IE18 d'*Arabidopsis thaliana*.

Dans un premier temps, nous avons essayé de surexprimer ces protéines chez *Escherichia coli* BLR(DE3). Les annexes 8 à 10 résument la stratégie utilisée pour cloner les ADNc codant les formes matures des protéines IE16-1 et p16-2 fusionnées à une étiquette poly-histidine, et l'ADNc codant la protéine IE18 sous forme mature. Quelles que soient les conditions d'expression que nous avons utilisées (variations de concentration en IPTG, de température, de souches bactériennes), nous n'avons jamais observé d'expression de ces protéines. D'autres tentatives réalisées au laboratoire suggèrent aussi que les protéines chloroplastiques très hydrophobes ne sont pas synthétisées chez *E. coli*. Le problème vient probablement d'un effet toxique dû à ces protéines. De même, le transporteur de phosphate/triose phosphate de l'enveloppe n'a pu être exprimé chez *E. coli* (Flügge, 1999).

#### A. Surexpression des protéines IE18, IE16-1, p16-2 d'*A. thaliana* et ORF 229 de tabac dans un système d'expression eucaryote

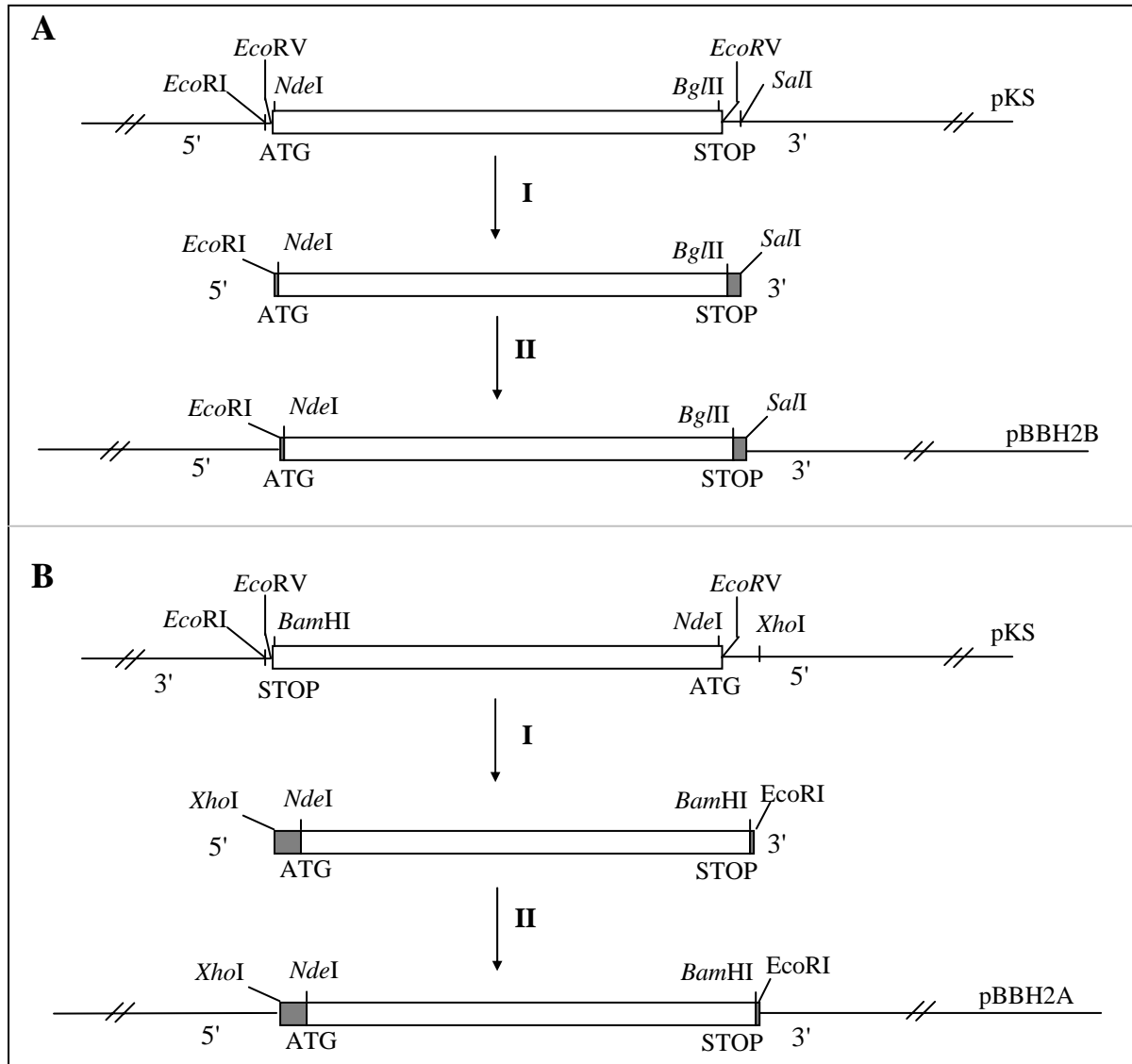
Les techniques d'expression chez *E. coli* s'étant avérées inefficaces pour toutes les protéines hydrophobes de l'enveloppe identifiées au laboratoire, nous avons entrepris de développer la technique d'expression eucaryote "cellules d'insecte/baculovirus". En principe ce système permet d'exprimer des protéines malgré leur toxicité.

Les trois protéines (IE16-1, p16-2 et IE18) d'*Arabidopsis thaliana* identifiées dans ce travail ont été surexprimées par ce système. En parallèle, nous avons aussi exprimé l'ORF 229 de tabac (homologue de la protéine Ycf10, Rolland *et al.*, 1997). Des essais infructueux d'expression de cette protéine ont été effectués chez *E. coli*, et dans des ovocytes de xénopes. La séquence de la protéine ORF229 est présentée en annexe 11. Les protéines ont été exprimées sous forme de fusion en N-terminal avec une séquence comprenant une étiquette poly-histidine et un épitope appelé Xpress (DLYDDDDK). Ceci permet d'une part de purifier ces protéines par chromatographie d'affinité sur matrice de nickel, et d'autre part de les détecter en utilisant un anticorps dirigé contre l'épitope Xpress.

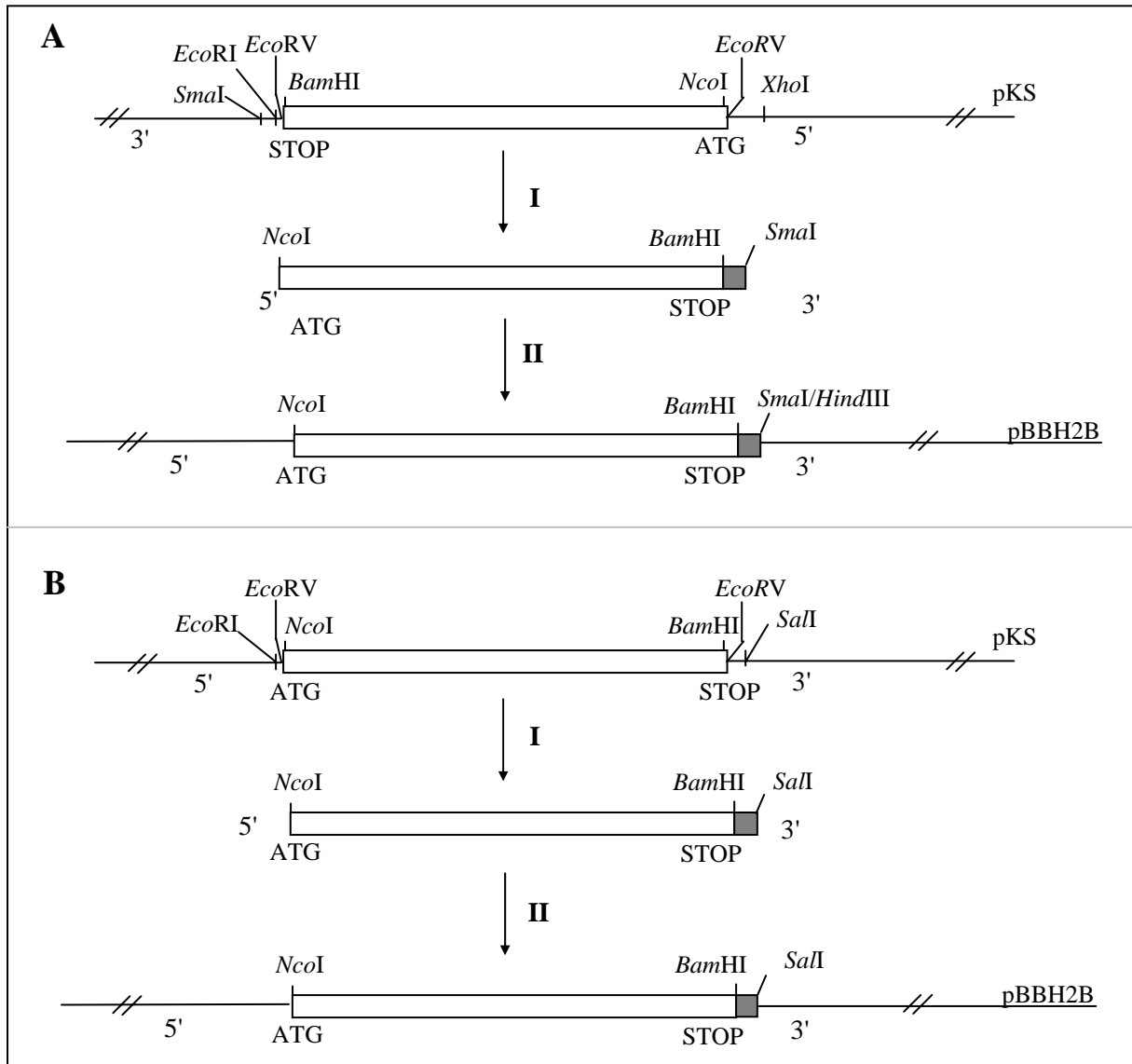
#### 1. Construction des plasmides

Les virus recombinants sont obtenus par une cotransfection avec de l'ADN viral linéarisé et un vecteur recombinant, le plasmide pBlueBacHis2 contenant l'ADNc de la protéine à exprimer. Les figures 39 et 40 décrivent l'obtention des vecteurs recombinants.

Les virus recombinants expriment aussi la  $\beta$ -galactosidase, ainsi les plages de lyse recombinantes deviennent bleues en présence de X-gal. Les virus contenant les ADNc codant les protéines IE18, IE16-1, p16-2 et ORF229 sont appelés respectivement baculovirus/18, baculovirus/16-1, baculovirus/16-2 et baculovirus/ORF.



**Figure 39. Construction des plasmides pBBH2B/16-1 (A) et pBBH2A/16-2 (B).** A. Construction du plasmide pBBH2B/16-1. I. L'insert est obtenu à partir de la construction pBluescript/16-1, après digestion enzymatique au niveau des sites *EcoRI* et *SalI*. Les rectangles gris correspondent aux acides nucléotidiques provenant du plasmide pBluescript(KS). II. La construction pBlueBacHis2B/16-1 est obtenue par ligation de l'insert dans le plasmide pBlueBacHis2B (pBBH2B) ouvert au niveau des sites *EcoRI* et *SalI*. B. Construction du plasmide pBBH2A/16-2. I. L'insert est obtenu à partir de la construction pBluescript/16-2, après digestion enzymatique au niveau des sites *XhoI* et *EcoRI*. Les acides nucléotidiques provenant du plasmide pBluescript(KS) sont indiqués par les rectangles noirs. II. La construction pBlueBacHis2A/16-2 est obtenue par ligation de l'insert dans le plasmide pBlueBacHis2A (pBBH2A) ouvert au niveau des sites *XhoI* et *EcoRI*.

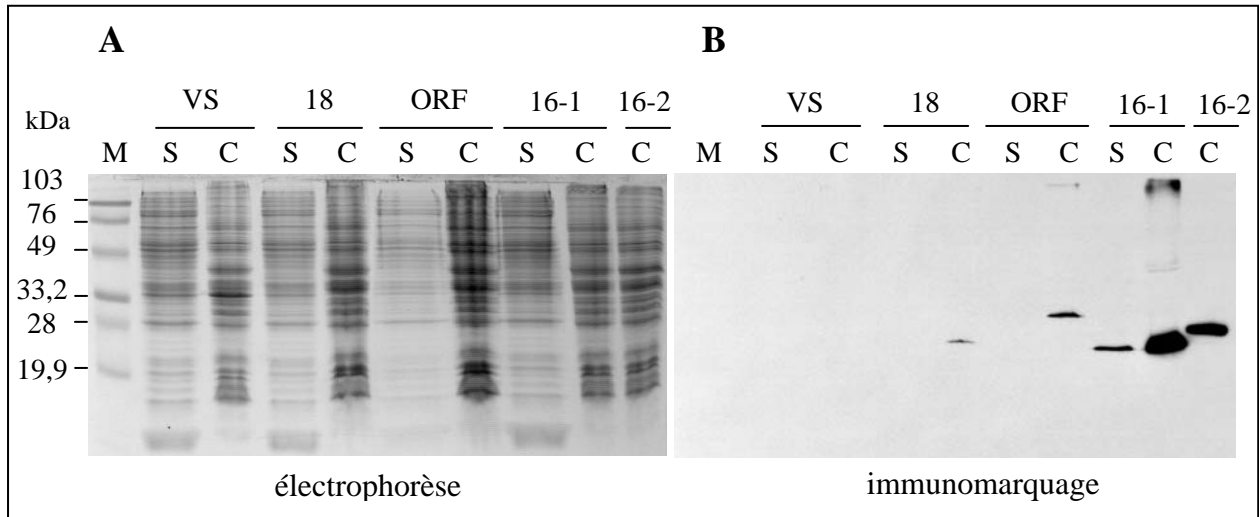


**Figure 40. Construction des plasmides pBBH2B/18 et pBBH2B/ORF229.** **A.** Construction du plasmide pBBH2B/18. **I.** L'insert est obtenu à partir de la construction pBluescript/18 sans l'étiquette poly-histidine, après digestion enzymatique au niveau des sites *NcoI* et *SmaI*. Les acides nucléotidiques provenant du plasmide pBluescript(KS) sont indiqués par les rectangles gris. **II.** La construction pBlueBacHis2A/18 est obtenue par ligation de l'insert dans le plasmide pBlueBacHis2B (pBBH2B). Ce plasmide est dans un premier temps ouvert au niveau du site *HindIII*, et traité par la Klenow pour obtenir des bouts francs. Une deuxième digestion est ensuite effectuée par l'enzyme *NcoI*. Le site *SmaI* est un site à bouts francs donc compatible avec le site *HindIII* dont les extrémités ont été rendues franches. **B.** Construction du plasmide pBBH2B/ORF229. **I.** L'insert est obtenu à partir d'une construction dans le plasmide pBluescript(KS), après digestion enzymatique au niveau des sites *NcoI* et *SalI*. Les rectangles gris correspondent à des acides nucléotidiques provenant du plasmide pBluescript(KS). **II.** La construction pBlueBacHis2B/ORF229 est obtenue par ligation de l'insert dans le plasmide pBlueBacHis2B (pBBH2B) ouvert au niveau des sites *NcoI* et *SalI*.

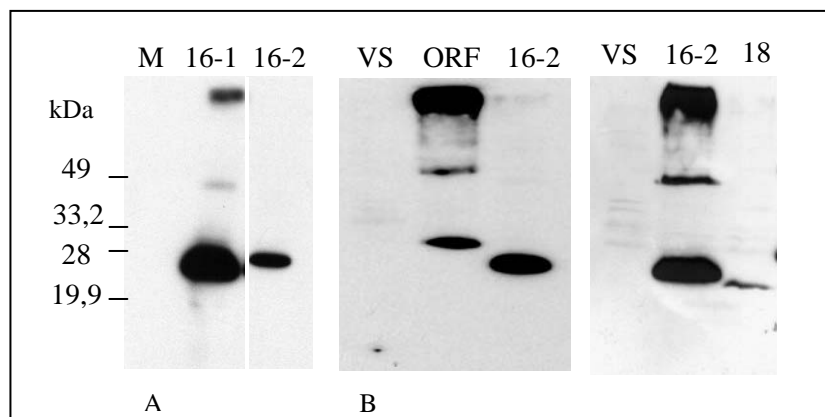
## 2. Surexpression des protéines IE18, IE16-1, p16-2 et ORF229

Les cellules d'insecte (50 ml d'une suspension à  $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont infectées par le virus à un MOI de 5, et récoltées 48 h après l'infection. Les cellules sont lysées et les fractions membranaires et solubles sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes et par

immunomarquage en utilisant un anticorps dirigé contre l'épitope Xpress. La figure 41 montre que les 4 protéines sont surexprimées. Les protéines IE16-1 et p16-2 sont plus fortement exprimées que les protéines ORF229 et IE18. Une partie de la protéine IE16-1 est présente dans la fraction soluble, qui contient probablement des membranes résiduelles.



**Figure 41. Analyse des expressions de différentes protéines dans les cellules d'insecte.** Les cellules *Sf9* ont été infectées par du virus sauvage (VS), ou par des virus recombinants contenant les séquences des protéines ORF 229 de tabac (ORF), et IE18 (18), IE16-1 (16-1) et p16-2 (16-2) d'*Arabidopsis thaliana*. Les cellules sont infectées à un MOI de 5 et sont récoltées 48 h après l'infection. Les cellules sont alors cassées et centrifugées 1 h à 100 000 g. Deux fractions sont obtenues, le culot (C) contenant la fraction membranaire et le surnageant (S). Les protéines contenues dans ces fractions sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (A) et par immunomarquage (B) avec un anticorps dirigé contre l'épitope Xpress situé en 5' des protéines recombinantes.



**Figure 42. Analyse de culots de membranes de cellules d'insecte après 10 jours d'infection par différents virus.** Les cellules d'insecte en phase logarithmique de croissance sont infectées par du virus sauvage (VS) ou du virus recombinant contenant les ADNc codant les protéines IE16-1 (16-1), IE18 (18) et p16-2 (16-2) d'*Arabidopsis thaliana* et ORF 229 de tabac (ORF). Après 10 jours d'infection, les culots de membranes des cellules sont récupérés et la présence des protéines recombinantes est analysée par immunodétection. Les protéines sont révélées par un anticorps dirigé contre l'épitope Xpress des protéines recombinantes, après une révélation par chimiluminescence. 50 µg de protéines totales par puits. La protéine p16-2 révélée dans les figures A et B a été obtenue après une infection de 48 h. M : marqueurs de masse moléculaire.

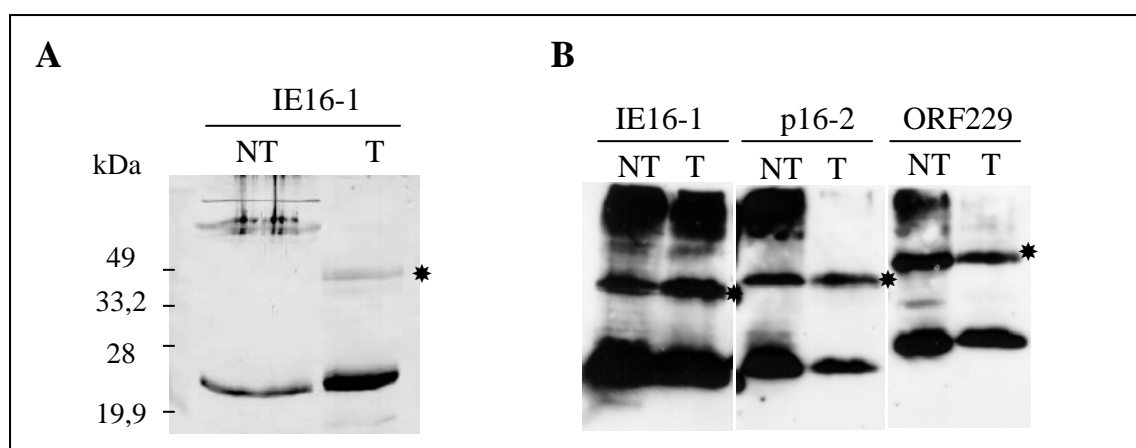
## B. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes

Ces protéines sont faiblement exprimées, et cela ne permet pas de les visualiser sur gels colorés au bleu de Coomassie. Afin d'augmenter les quantités de protéines produites, nous avons effectué des infections sur une période plus longue (10 à 12 jours). Les protéines membranaires sont très stables en général, il est donc possible d'infecter les cellules sur une longue période. La figure 42 montre par immunomarquage les quantités de protéines obtenues après 10 jours d'infection. Dans ces conditions, les quantités des protéines recombinantes IE16-1, p16-2 et ORF sont plus importantes, seule la quantité de protéine recombinante IE18 reste très faible. Ces protéines restent cependant difficilement identifiables sur gel après coloration au bleu de Coomassie.

### 1. Expériences de pontage chimique

Les transporteurs IE30, OEP16 et OEP34 de l'enveloppe du chloroplaste possèdent peu de domaines transmembranaires (par rapport à la plupart des transporteurs), et forment des homodimères (Flügge, 1985 ; Pohlmeier *et al.*, 1997 ; 1998). Les protéines IE18, IE16-1, p16-2 et ORF229 pouvant être des transporteurs et contenant chacune des cystéines, nous avons analysé leur capacité à former des dimères. De plus, l'analyse de la plupart des échantillons (contenant les protéines recombinantes) par immunodétection montre la présence de polypeptides qui pourraient correspondre à des dimères des protéines recombinantes.

Nous avons utilisé l'agent pontant BS<sup>3</sup> (bis (sulfosuccinimidyl) subérate) qui crée une liaison covalente au niveau des groupes SH des cystéines de la protéine. Ce pontage chimique n'est possible que si les cystéines de la protéine sont proches l'une de l'autre dans l'espace. Les échantillons traités sont ensuite analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes.



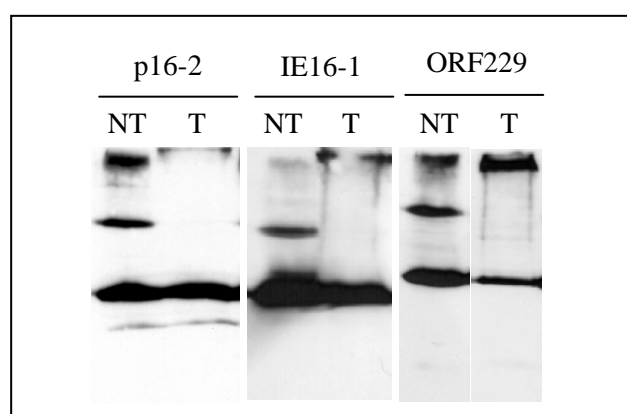
**Figure 43. Formation de dimères par pontage chimique.** Les protéines recombinantes, obtenues dans la fraction membranaire de cellules infectées pendant 10 jours, sont traitées par du BS<sup>3</sup> 1 mM (T, traité) pendant 30 min puis sont analysées par marquage immunologique. A : immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine IE16-1 d'*Arabidopsis thaliana*, et révélation à la phosphatase alcaline. B : immunomarquage avec un anticorps dirigé contre l'épitope Xpress, révélation par chimiluminescence. NT : protéines non traitées. 50 µg de protéines par puits. Les positions des dimères des différentes protéines sont indiquées par les étoiles.

La figure 43A montre la présence d'un dimère de IE16-1 après traitement au BS<sup>3</sup> et immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine IE16-1. Ce dimère n'était pas visible avant le traitement. En revanche, les immunodétections présentées dans la figure 43B ne montrent pas de changements significatifs dans la quantité de dimères visibles dans le gel avant et après le traitement. Ces observations suggèrent que ces différentes protéines IE16-1, p16-2 et ORF229 pourraient former des homodimères.

## 2. Réduction des ponts disulfure

La plupart des analyses par immunomarquage des protéines exprimées dans les cellules d'insecte montrent la présence de polypeptides qui pourraient correspondre à des dimères.

Etant donné que les expériences de pontage chimique n'augmentent pas significativement la quantité du dimère potentiel dans les conditions testées, nous avons essayé de réduire totalement les ponts disulfure de ces protéines. En effet, les ponts disulfure difficilement accessibles peuvent être présents dans la protéine et ne pas être réduits en présence de faible concentration de DTT. Nous avons donc analysé ces protéines par immunomarquage après un traitement à 50°C pendant 2 h 30 et en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol 5 %. La figure 44 montre que les dimères disparaissent après ce traitement. Ces résultats confirment donc la possibilité de formation de dimères pour les protéines IE16-1, p16-2 et ORF229.



**Figure 44. Analyse des protéines exprimées dans les cellules d'insecte en présence d'un agent réducteur fort.** Les protéines (p16-2, IE16-1 et ORF229) surexprimées dans les cellules d'insecte sont analysées par marquage immunologique avec un anticorps dirigé contre l'épitope Xpress. Les protéines sont soit directement solubilisées dans du tampon de dépôt 1X (NT, non traité), soit solubilisées dans du tampon de dépôt 1X en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%, et incubation 2 h 30 à 50°C (T, traité). Chaque échantillon est ensuite chauffé 3 min à 95°C. 50  $\mu$ g de protéines par puits.

## 3. Mesures d'activité canal ionique après insertion dans des bicouches lipidiques planes

En collaboration avec Fabrice Homblé (Université Libre de Bruxelles, Belgique), nous avons utilisé le système d'insertion dans des bicouches lipidiques planes pour tester la capacité de canal ionique de ces protéines. Les membranes de cellules d'insecte infectées par les différents virus recombinants sont collectées après 10 ou 12 jours de culture. Les membranes de cellules d'insecte contenant les protéines recombinantes sont ensuite fusionnées à des bicouches



lipidiques. Les premiers tests sont effectués sur les membranes totales des cellules d'insecte contenant les protéines recombinantes. Si les protéines étudiées forment des canaux ioniques de caractéristiques différentes de ceux appartenant à la cellule hôte, ils pourront être détectés. Dans le cas contraire, les protéines recombinantes seront purifiées, puis insérées dans les bicouches pour les mesures d'électrophysiologie. Ces expériences sont en cours actuellement. Selon les résultats obtenus, d'autres analyses pourront être effectuées en insérant ces protéines dans des liposomes et en suivant les variations de turbidité de la suspension induites par ajout de molécules dans le milieu. Cette dernière technique permet de mettre en évidence des systèmes de transport de molécules non ioniques. Par ailleurs, il sera aussi possible d'utiliser des molécules ou des ions radioactifs pour suivre leur flux dans un système donné.

#### IV. CONCLUSION

La recherche des fonctions de protéines inconnues est une tâche très longue qui requiert la mise en place de nombreux outils. C'est ce que nous avons tenté de réaliser au cours de ce travail, afin de révéler des éléments objectifs permettant d'orienter la recherche de la fonction des protéines IE16 et IE18. Pour cela, nous avons mis en œuvre au sein de l'équipe des approches de bioinformatique, des approches de génétique inverse et des approches biochimiques.

L'*approche bioinformatique* repose sur une analyse exhaustive des banques de données disponibles. Nous avons ainsi pu montrer que des protéines homologues à IE16 et IE18 existaient tant chez les cyanobactéries que les algues rouges, les algues vertes ou les plantes supérieures. De fait, la quasi totalité des séquences protéiques présentant un niveau d'homologie acceptable avec les séquences des protéines IE16 et IE18 ont été trouvées chez des organismes photosynthétiques. Dans tous les cas, les caractéristiques physicochimiques de ces protéines, telles qu'on peut les déduire des séquences peptidiques, sont compatibles avec une localisation dans l'enveloppe du chloroplaste. Enfin, l'annotation des séquences indique que les homologues des protéines IE16 et IE18 pourraient être impliqués dans différents types de transport. Si les homologies trouvées ne permettent pas, dans l'état actuel de nos recherches, d'orienter sans aucune ambiguïté nos recherches fonctionnelles, elles permettent cependant de valider la stratégie que nous avons mise en place.

Cette analyse *in silico* nous a aussi permis de soulever un certain nombre de questions originales quant à l'évolution de la localisation des gènes codant des protéines de l'enveloppe. Ainsi, la présence du gène *ie16* dans le génome chloroplastique des algues rouges suggère une localisation dans l'enveloppe des chloroplastes qui demande à être confirmée. Or on ne connaît actuellement qu'une seule protéine localisée dans l'enveloppe des chloroplastes et qui soit codée par le génome chloroplastique, Ycf10 (Rolland *et al.*, 1997). Si tel était le cas chez les algues rouges pour l'homologue de IE16, de nombreuses perspectives originales pourraient être ouvertes, en particulier pour analyser l'évolution des séquences d'adressage (voir p. 101).

L'**approche génétique** que nous avons développée a été mise en œuvre dans l'espoir que les phénotypes des mutants pourraient orienter nos recherches fonctionnelles. Les deux systèmes que nous avons développés, *Synechocystis* et *Arabidopsis*, sont totalement complémentaires. Le choix des cyanobactéries s'est imposé naturellement parce que l'homologie de la membrane plasmique de ces procaryotes photosynthétiques avec l'enveloppe des chloroplastes est considérable (Joyard *et al.*, 1987). Ainsi, cet outil génétique remarquable qu'est *Synechocystis* PCC6803 permet assez facilement de manipuler des protéines homologues à des protéines d'enveloppe, d'analyser les phénotypes des mutants obtenus avec une relative aisance et d'avoir accès à l'environnement physiologique du système membranaire homologue à l'enveloppe. Les expériences réalisées pour analyser le phénotype du mutant de *Synechocystis* homologue au gène *ie18* suggère une implication de la protéine IE18 dans une activité canal  $K^+$  ou un échangeur  $K^+/H^+$ . Si ce type de phénotype est confirmé par les expériences en cours, il orientera nettement nos recherches impliquant les autres approches fonctionnelles, que ce soit l'analyse des mutants d'*Arabidopsis* ou l'approche biochimique.

Le criblage par PCR de la banque d'insertion de l'INRA de Versailles a permis d'obtenir plusieurs mutants correspondant aux protéines étudiées. Deux mutants (ACE3 et ABH11) possédant chacun une insertion différente de l'ADN-T dans le gène *ie18* (voir figure 38) ont été obtenus. Dans les conditions normales de croissance, ces mutants ne présentent pas de phénotypes visibles. De même, nous avons obtenu deux mutants (ABC9 et DIF6) pour le gène *ie16-1* ayant respectivement l'insertion de l'ADN-T dans la séquence codante et non codante du gène (figure 38). Un quart des plantes ABC9 a une croissance très affectée. L'identification des plantes homozygotes (pour le gène altéré) et l'obtention de lots de graines correspondants sont en cours actuellement.

Enfin, l'**approche biochimique** entreprise avait pour objectif de préparer en quantité suffisante les protéines (essentiellement IE16 et IE18) pour réaliser un certain nombre d'études fonctionnelles. Le système d'expression cellules d'insecte/baculovirus s'est révélé particulièrement efficace pour produire des protéines aussi hydrophobes. Les premières analyses biochimiques montrent que ces protéines forment des homodimères dans les cellules d'insecte. Or le transporteur de phosphate/triose phosphate (Flügge *et al.*, 1998) ou les canaux OEP16 et OEP24 de l'enveloppe (Polhmeyer *et al.*, 1997, 1998) existent *in situ* sous forme de dimères. Des études électrophysiologiques sont en cours pour déterminer si IE16 et IE18 pourraient être des canaux ioniques. Les expériences effectuées consistent à fusionner les membranes de cellules d'insecte contenant les protéines recombinantes dans des bicouches lipidiques planes et à mesurer les courants à travers ces membranes dans différentes conditions. Si cette approche se révèle inefficace, les protéines seront alors purifiées afin d'effectuer les mêmes tests sur les protéines pures.

## CHAPITRE III

### ETUDE DE L'INTERACTION DE L'ANNEXINE AVEC L'ENVELOPPE DU CHLOROPLASTE

Lors de l'analyse des protéines de l'enveloppe solubles dans les mélanges chloroforme/méthanol, le microséquençage d'une bande de 35 kDa après coloration au bleu de Coomassie a permis d'identifier différents peptides, dont un correspondait à la protéine IE37. Une autre séquence présentait 94 % d'identité avec celle d'une EST d'*Arabidopsis thaliana* (Numéro d'accèsion EMBL : Z18518, clone n° TAY008). Nous nous sommes procurés le plasmide contenant cette EST (fourni par Jérôme Giraudat, ISV, Gif-sur-Yvette) et avons séquencé l'ADNc complet. Cet ADNc code une protéine qui présente 30 à 40 % d'homologie de séquence avec les diverses annexines animales et végétales déjà isolées (voir revues de Clark & Roux, 1995 ; Delmer & Potikha, 1997).

Les annexines forment un groupe de protéines caractérisées par leur capacité à fixer des phospholipides spécifiques de façon  $Ca^{2+}$ -dépendante. Ces protéines se distinguent des autres protéines capables de fixer le calcium (comme la calmoduline, la troponine qui fixent le calcium grâce à une structure hélice-boucle-hélice connue sous le nom de main EF) par l'existence d'une séquence conservée de 17 acides aminés située au sein de domaines bien caractérisés de 70 à 80 acides aminés (domaines qui sont répétés 4 ou 8 fois et qui forment le cœur de la protéine) (Crompton *et al.*, 1988). Ces domaines conservés présentent une région fixant le calcium et les lipides polaires. Le domaine *N*-terminal est en revanche spécifique de chaque annexine, il diffère dans le nombre et la composition des acides aminés. Ce domaine amino-terminal serait responsable des différences fonctionnelles des annexines (Raynal & Pollard, 1994). Les annexines ont en général une affinité plus faible pour le calcium que la calmoduline. Les annexines sont connues pour s'associer de façon périphérique aux bicouches lipidiques et il semblerait qu'elles puissent s'insérer dans les membranes où elles formeraient des canaux transmembranaires (Swairjo & Seaton, 1994).

La fonction spécifique de chaque annexine n'est pas clairement définie. Il semble que les annexines soient multifonctionnelles et qu'elles puissent être impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques. En particulier, elles seraient impliquées dans la régulation de l'organisation membranaire, le trafic vésiculaire, la fixation du cytosquelette aux membranes, et la conductance ionique à travers les membranes (voir revues de Gerke & Moss, 1997 ; Raynal & Pollard, 1994). L'interaction des annexines avec le calcium suggère aussi un rôle dans les processus de signalisation impliquant ce messager secondaire (Clark & Roux, 1995). D'autres travaux suggèrent enfin une participation des annexines aux réactions des plantes à des stress biotiques ou abiotiques (Gidrol *et al.*, 1996 ; Kovács *et al.*, 1998).

Dans la cellule végétale, les annexines ont été localisées dans de nombreuses membranes (Clark & Roux, 1995), mais aucune association avec les membranes de chloroplaste n'avait été rapportée jusqu'à présent. La présence de cette protéine dans l'enveloppe et sa caractérisation sont intéressantes à plus d'un titre. Tout d'abord, les annexines sont connues pour se fixer sur les phospholipides acides, or les membranes des plastes sont majoritairement composées de glycolipides. Il est donc important de déterminer la nature des glycolipides qui permettent l'association de l'annexine à l'enveloppe. Il faut en effet déterminer comment cette protéine interagit avec les membranes d'enveloppe si l'on veut ensuite comprendre son rôle physiologique et analyser les processus qui pourraient réguler cette interaction. Enfin, on peut se poser la question de l'implication potentielle de l'annexine de l'enveloppe dans le transport du calcium et la formation de canaux ioniques.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'interaction de l'annexine avec l'enveloppe du chloroplaste. Pour cela, nous avons testé (a) la spécificité et l'affinité de l'interaction de l'annexine purifiée avec les différents lipides présents dans l'enveloppe, et (b) la capacité de l'annexine à copurifier et interagir avec les chloroplastes ou les membranes d'enveloppe de manière  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante. Ayant montré la possibilité d'une interaction avec l'enveloppe, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de cette protéine dans le chloroplaste.

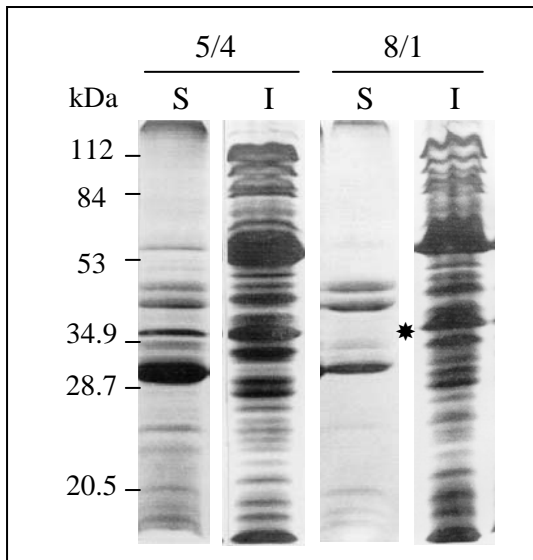
## I. CARACTERISATION DE L'ANNEXINE ASSOCIEE A L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES

### A. Identification d'une annexine dans l'enveloppe des chloroplastes d'épinard

Afin d'identifier les protéines de l'enveloppe extraites dans les solvants organiques, nous avons notamment analysé les protéines présentes dans une bande colorée au bleu de Coomassie autour de 35 kD. Deux séquences internes ont ainsi été obtenues. La première [(K)NVTILDQSPHQLAK] présente 100 % d'identité avec IE37 (Dreses-Werringloer *et al.*, 1991). La deuxième séquence obtenue [(K)VS DSV P AP(D/S)(D/S)DAEQLRS] présente 94 % d'identité avec une EST d'*Arabidopsis thaliana*. La figure 45 montre que les polypeptides contenus dans cette bande pourraient *a priori* correspondre à des protéines d'hydrophobicité modérée. En effet, ils sont présents dans les extractions effectuées en présence de chloroforme/méthanol 5/4 [v/v] (figure 45A), mais ne sont pas extraits en présence de chloroforme/méthanol 8/1 [v/v] (figure 45B).

Nous avons séquencé l'ADNc complet de cette EST et montré qu'elle présente de fortes homologies avec les annexines (figure 46A). La figure 46B présente les homologies entre la séquence interne d'épinard et celles de diverses annexines de plantes. C'est une isoforme d'*Arabidopsis* qui présente la plus forte identité avec la séquence interne obtenue à partir de la protéine de l'enveloppe de chloroplastes d'épinard. Les annexines sont des protéines solubles

qui peuvent s'insérer dans les membranes lipidiques. Elles ne sont donc pas très hydrophobes, ce qui est en accord avec leur présence dans les extractions chloroforme/méthanol 5/4 [v/v].



**Figure 45. Extraction différentielle des protéines de l'enveloppe du chloroplaste dans des mélanges de chloroforme/méthanol.**

Les protéines de l'enveloppe sont extraites dans des solutions contenant différentes proportions de chloroforme/méthanol [v/v]. Après l'extraction, les protéines solubles (S) et insolubles (I) dans les solvants organiques sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La bande à 37 kDa après coloration au bleu de Coomassie est indiquée par une étoile.

## B. Production de l'annexine chez *Escherichia coli*

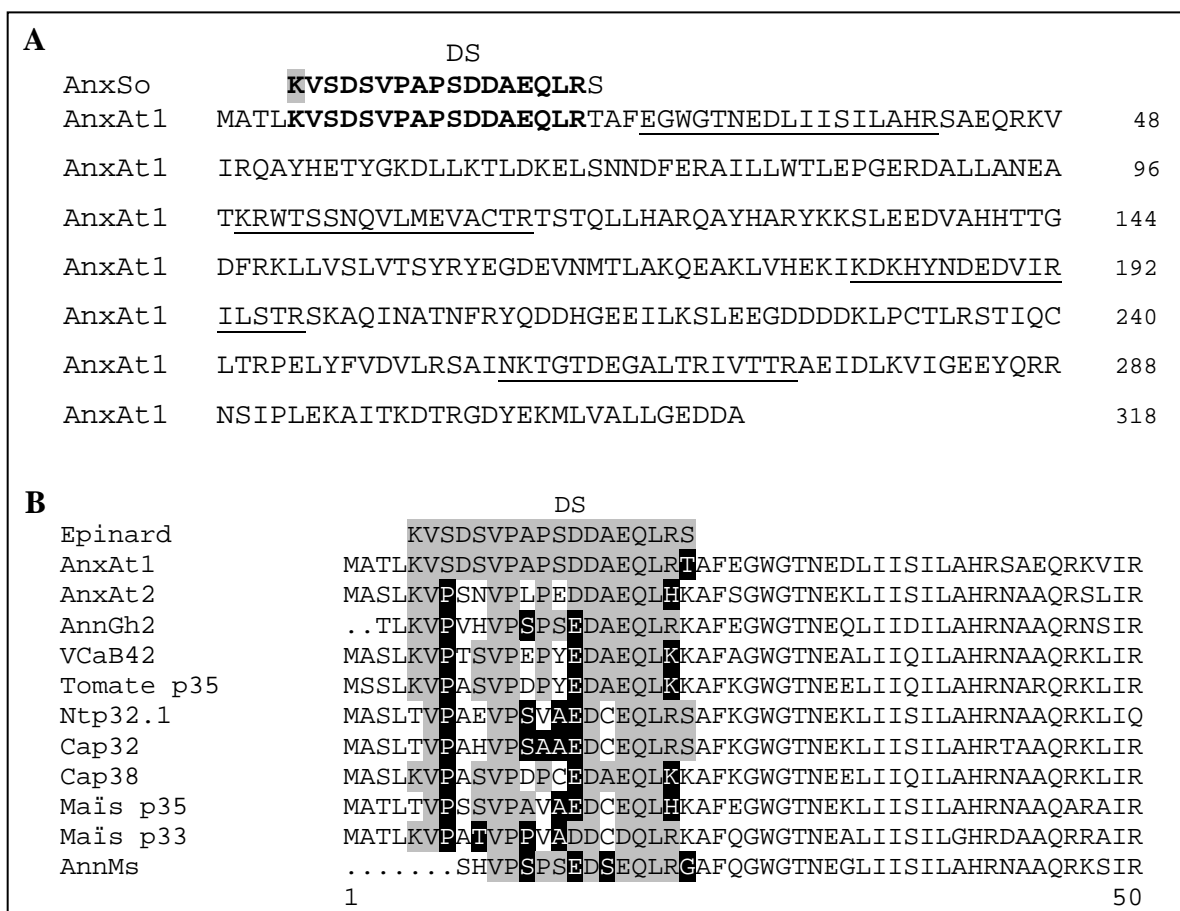
Nous avons utilisé la séquence de l'EST codant l'annexine d'*Arabidopsis* pour effectuer un criblage d'une banque d'ADNc (dans  $\lambda$ gt11) d'épinard afin d'obtenir l'ADNc codant l'annexine d'épinard. Sur 100 000 phages criblés, aucun clone positif n'a été obtenu. La banque d'ADNc utilisée a été effectuée à partir d'ARNm provenant de feuilles matures. Or il semblerait que les transcrits d'annexine soient présents surtout dans les tissus jeunes (Smallwood *et al.*, 1992), ce qui expliquerait notre résultat. Le nombre de phages criblés est aussi un facteur à prendre en compte (faible représentation des transcrits). Nous avons donc décidé d'utiliser l'ADNc d'*A. thaliana* pour surexprimer la protéine correspondante chez *E. coli*.

### 1. Surexpression de l'annexine chez *E. coli*

L'annexine d'*Arabidopsis* a été surexprimée, soit sous forme de protéine de fusion avec une séquence poly-histidine en *N*-terminal (protéine étiquetée), soit sous forme mature. Les protéines étant exprimées dans les corps d'inclusion, nous avons cherché à les obtenir sous forme soluble en modifiant les conditions d'expression (température, concentrations d'IPTG, différentes souches bactériennes utilisées).

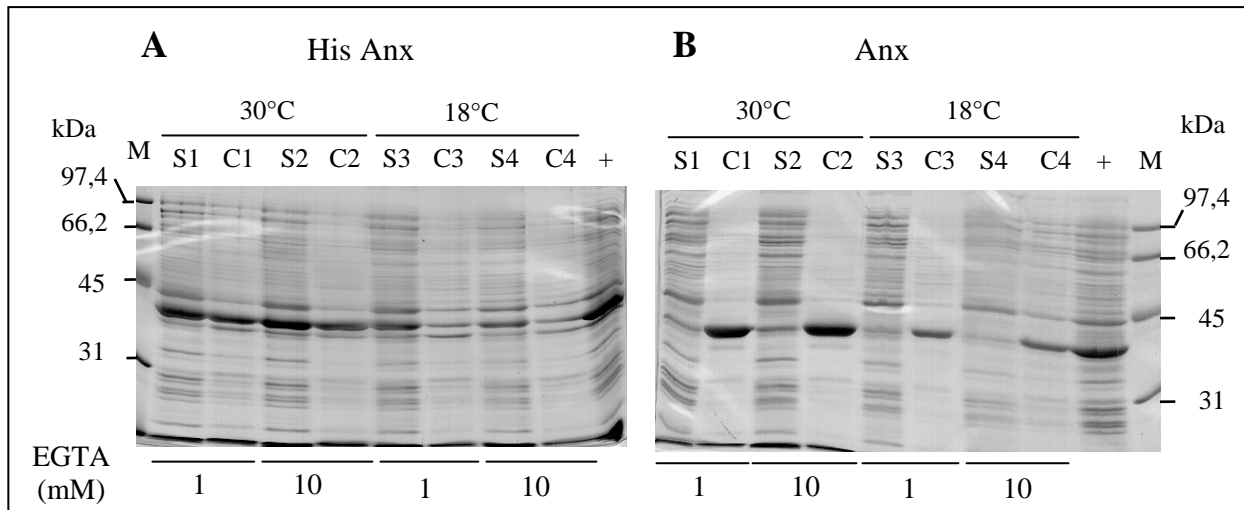
En fin d'induction, les bactéries sont lysées et les protéines bactériennes sont centrifugées afin de séparer les protéines solubles, membranaires ou présentes dans les corps d'inclusion. Les protéines sont ensuite analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Quelles que soient les conditions d'expression utilisées, la protéine sous forme mature est toujours retrouvée dans les corps d'inclusion (figure 47B). Même l'utilisation de Triton X-100 (0,1 %

[v/v]) ne permet pas de solubiliser cette protéine (non montré). L'annexine se fixant aux membranes via le calcium, de l'EGTA a été ajouté dans les milieux afin d'augmenter éventuellement la solubilité de l'annexine.

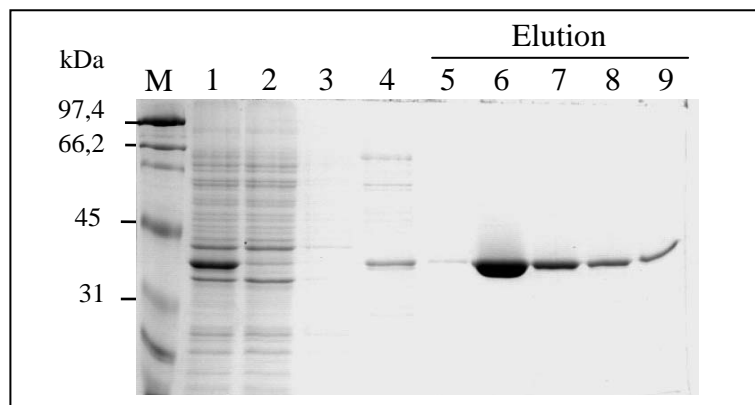


**Figure 46. Alignements des séquences d'annexine et de la séquence interne de la protéine d'épinard.** **A.** Alignement de la séquence peptidique de l'annexine d'*Arabidopsis* (AnxAt1) et de la séquence interne obtenue pour l'annexine d'épinard. Les acides aminés identiques entre les deux séquences sont indiqués en caractères gras (94 % d'identité sur 18 acides aminés). La boîte gris clair indique le résidu putatif (K) déduit lors du microséquençage d'après la spécificité de l'endoprotéase utilisée. Les acides aminés soulignés dans la séquence de l'annexine d'*Arabidopsis* correspondent à la région conservée ("l'endonexin fold") caractéristique des annexines. At, *Arabidopsis thaliana*. So, *Spinacia oleracea*. **B.** Homologies de séquences entre le peptide interne obtenu pour la protéine d'épinard et plusieurs annexines de plantes. Le peptide interne a été obtenu après digestion à l'endolysine d'une protéine de l'enveloppe de 35 kDa. Les boîtes grises indiquent les acides aminés identiques, et les boîtes noires les résidus homologues.

AnxAt1 : *Arabidopsis thaliana*, (Gidrol *et al.*, 1996) (n° accession EMBL U28415) ; AnxAt2 : *Arabidopsis thaliana*, (Clark & Roux, 1999) (n° accession EMBL AF083914) ; AnnGh2 : coton (Andrawis *et al.*, 1993) (n° accession EMBL U73747) ; VCaB42 : cèleri (Seals *et al.*, 1994) (n° accession EMBL AF113545) ; Tomate p35 : tomate (Lim *et al.*, 1998) (n° accession EMBL AF079231) ; Ntp32.1 : cellules de tabac BY2 (Proust *et al.*, 1999) (n° accession EMBL Y14972) ; Maïs p33 et Maïs p35 : maïs (Battey *et al.*, 1996) (n° accession EMBL X98244 pour p33, X98245 pour p35) ; AnnMs : alfalfa (Pirck *et al.*, 1994) (n° accession EMBL X74947) ; Cap32 : poivron (ou *Capsicum*) (Proust *et al.*, 1996) (n° accession EMBL X93308) ; Cap38 : poivron (Proust *et al.*, non publié) (n° accession EMBL AJ130956).



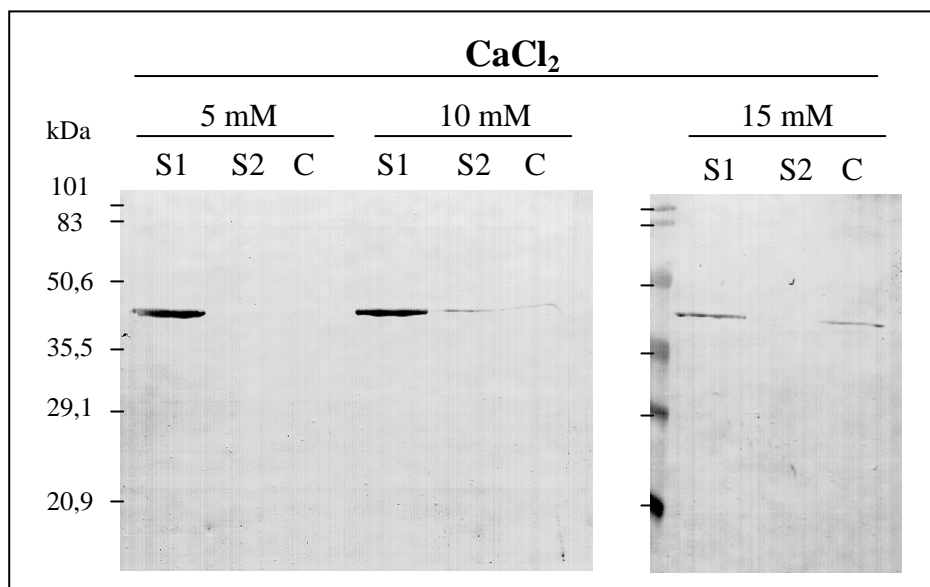
**Figure 47. Solubilisation de l'annexine recombinante sous forme étiquetée avec une séquence poly-histidine (His Anx) et sous forme mature (Anx).** Après induction de l'expression de la protéine recombinante, une aliquote de la culture est prélevée, centrifugée et remise en suspension dans différents milieux. Après sonication, l'ensemble est centrifugé afin de récupérer une fraction soluble (S) correspondant au surnageant, et une fraction insoluble (C, culot). Les protéines sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. **A.** Production de la protéine étiquetée. La composition des milieux est la suivante : imidazole 5 mM, NaCl 0,5 M, Tris/HCl 20 mM (pH 7,9), en présence d'EGTA 1 mM pour les puits S1, C1 et S3, C3, et d'EGTA 10 mM pour les puits S2, C2 et S4, C4. L'induction de l'expression de la protéine a été effectuée à 30°C pour les puits S1, C1 et S2, C2 et à 18°C pour les puits S3, C3 et S4, C4. Lorsque l'induction est effectuée à 30°C, 50 % de la protéine étiquetée est soluble. En revanche, la quasi totalité de la protéine est soluble lors d'une induction à 18°C mais la quantité totale de protéine produite est plus faible. **B.** Production de la protéine mature. Les tampons utilisés sont constitués de Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 0,2 M, MgCl<sub>2</sub> 2 mM pour les puits puits S1, C1 et S3, C3, et de Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), EGTA 10 mM pour les puits S2, C2 et S4, C4. L'induction de l'expression de la protéine a été effectuée à 30°C pour les puits S1, C1 et S2, C2 et à 18°C pour les S3, C3 et S4, C4.



**Figure 48. Purification de l'annexine étiquetée par chromatographie d'affinité.** L'annexine étiquetée contient une séquence poly-histidine qui permet la purification de la protéine par chromatographie d'affinité sur une matrice chargée en nickel. Les différentes fractions protéiques obtenues au cours de la purification (protéines non fixées, lavages, élution) sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes et coloration du gel au bleu de Coomassie. M, marqueurs de taille. 1, fraction protéique avant la purification. 2, fraction protéique non retenue sur la colonne de nickel. 3 et 4, protéines présentes dans les 2 tampons de lavage de la colonne (voir matériel et méthodes). 5 à 9, élution des protéines fixées sur la colonne (le même volume pour chaque fraction a été déposé).

Cependant, l'ajout d'EGTA ne semble pas avoir d'effet sur la solubilisation des annexines recombinantes mature et étiquetée. La protéine étiquetée obtenue après induction à 37° C se trouve dans la fraction membranaire mais une partie peut être solubilisée en présence de Triton X-100 0,1% [v/v] (résultats non montrés). En revanche, environ 50 % de la protéine étiquetée est soluble lorsque l'induction est effectuée à 30°C, sans utilisation de Triton X-100 (figure 47A). Le pourcentage de protéine soluble augmente si l'induction est effectuée à 18°C (figure 47A), mais dans ce cas la quantité totale de protéine recombinante obtenue est plus faible.

La fraction de protéine soluble a été purifiée par colonne d'affinité, grâce à la présence de la séquence poly-histidine (figure 48). Les fractions d'élution contiennent une protéine d'environ 36 kDa qui correspond à la protéine recombinante. La différence de masse moléculaire avec l'annexine native (35 kDa) est due à la présence de la séquence poly-histidine.



**Figure 49. Effet du calcium sur l'interaction de l'annexine avec des vésicules de phospholipides.** L'annexine recombinante étiquetée est incubée avec des vésicules de phospholipides (extrait de soja) en présence de concentrations variables de calcium. Après incubation, l'ensemble est centrifugé, le culot contenant les vésicules de lipides est lavé en présence de la même concentration de calcium puis de nouveau centrifugé. Les trois fractions obtenues (deux surnageants, S1 puis S2, le culot, C) sont analysées par marquage avec des anticorps dirigés contre l'annexine.

## 2. Test de fonctionnalité de la protéine recombinante

Les annexines ayant la capacité de se fixer aux lipides en présence de calcium, nous avons utilisé cette propriété pour tester l'activité de la protéine recombinante. La fixation est réalisée sur un mélange de lipides contenant 60 % de phospholipides (lipides extraits de soja). Les lipides sont incubés avec la protéine recombinante en présence de diverses concentrations de calcium. Après centrifugation, la présence de la protéine dans le surnageant ou dans le culot de vésicules de lipides est analysée par marquage immunologique réalisé avec un anticorps



dirigé contre l'annexine de maïs (Blackbourn *et al.*, 1991), fourni par N.H. Battey (Reading University, UK). La figure 49 montre que l'annexine recombinante se fixe totalement sur les lipides en présence de calcium 15 mM. En revanche, en présence de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, seuls quelques pour-cent sont fixés aux lipides, et aucune fixation n'est détectée pour des concentrations de CaCl<sub>2</sub> inférieures (5 mM). Cette association est réversible puisque la protéine est relarguée en présence d'EGTA.

Les concentrations de calcium nécessaires pour la fixation de l'annexine recombinante étant très élevées et non physiologiques (en général, les annexines se fixent aux lipides en présence de 100 à 500 µM de CaCl<sub>2</sub>), nous avons décidé de purifier la protéine native pour effectuer les tests d'interaction avec les différents lipides de l'enveloppe. La protéine recombinante n'a été utilisée par la suite que comme contrôle positif dans les expériences d'immunomarquage.

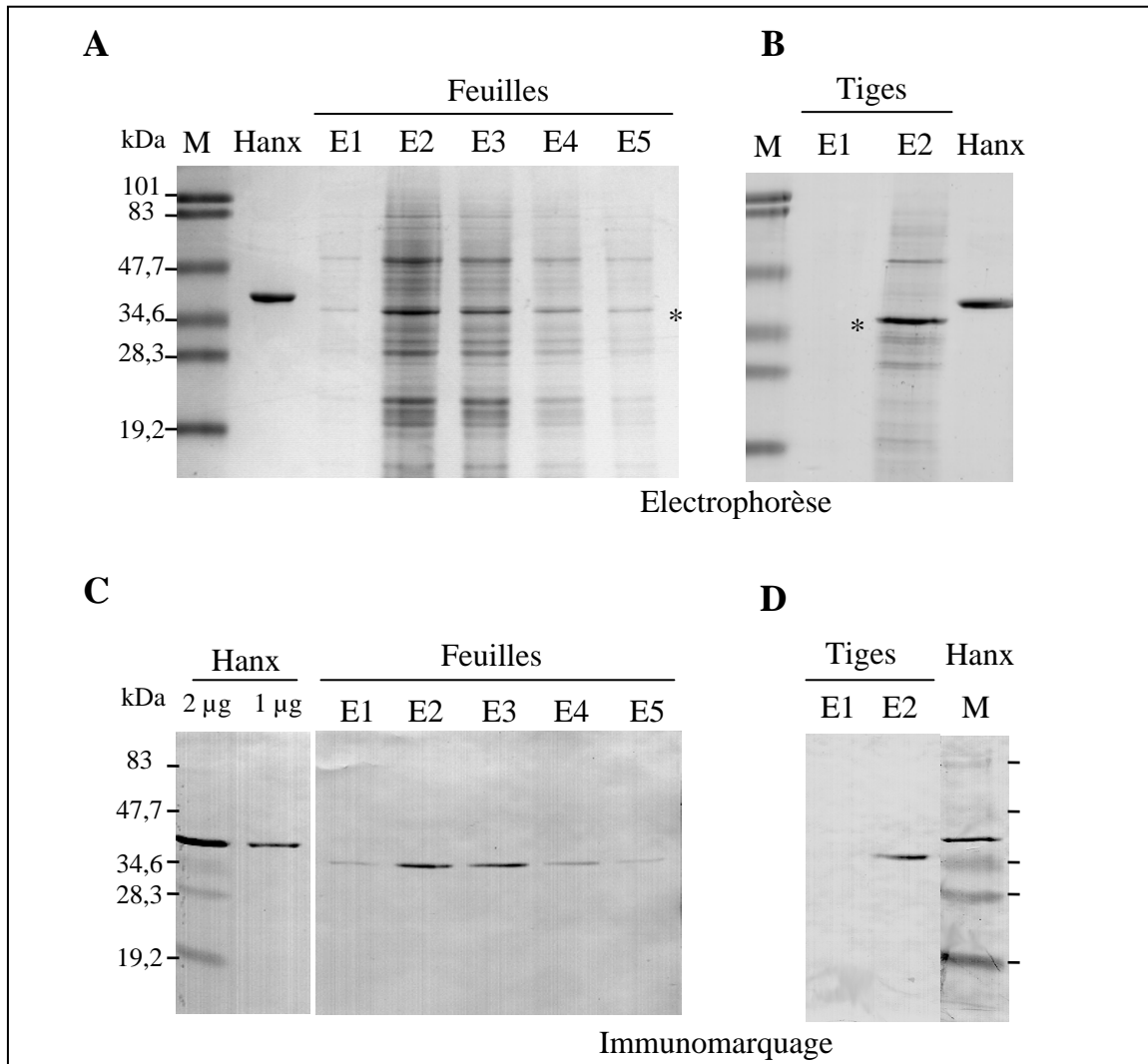
## **C. Purification de l'annexine native à partir de feuilles et de tiges d'épinard**

### **1. Protocole de purification de l'annexine**

L'annexine est isolée à partir de feuilles et de tiges de jeunes plants d'épinard en utilisant une méthode basée sur la capacité de cette protéine à fixer les phospholipides acides en présence de calcium. Sachant que l'annexine est vraisemblablement très peu représentée dans les feuilles matures (Smallwood *et al.*, 1990), nous avons effectué ces purifications à partir de jeunes plants d'épinard au stade 6 feuilles.

L'annexine est purifiée à partir de 50 g de matière fraîche d'après la méthode décrite par Boustead *et al.* (1989). Le tissu (feuilles ou tiges) est broyé dans l'azote liquide. La poudre obtenue est homogénéisée dans du tampon A (HEPES/NaOH 20 mM pH 7, NaCl 0,15 M) (rapport poids frais/volume tampon 1/3, [p/v]), et filtrée à travers 4 épaisseurs de gaze. De l'EGTA 1M est ajouté au filtrat afin d'obtenir une concentration finale de 10 mM. Ceci a pour effet de relarguer l'annexine dans le milieu. Après une incubation de 15 min dans la glace, la suspension est centrifugée à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et du CaCl<sub>2</sub> 1M est ajouté (concentration finale 15 mM). Une suspension fraîche de phospholipides préparée par homogénéisation dans un potter d'un extrait de lipides de soja (Type IV S, Sigma) dans 10 ml d'eau distillée est ajoutée à la suspension (5 mg de lipides/g de matière fraîche). Au cours de cette étape, l'annexine se fixe sur les lipides. Après une incubation de 30 min dans la glace, l'ensemble est centrifugé 30 min à 30 000 g, à 4°C. Le culot est lavé deux fois dans du tampon A contenant du CaCl<sub>2</sub> 3 mM. Le culot lavé est alors repris dans du tampon A contenant de l'EGTA 15 mM et incubé 10 min dans la glace. L'EGTA, chélatant du calcium, permet la libération des annexines dans le milieu. Une centrifugation à 100 000 g (Beckman, rotor SW50) pendant 1 h 30 permet d'éliminer les lipides. Le surnageant contenant l'annexine purifiée est ensuite dessalé sur une colonne PD10 (Pharmacia) contre un tampon HEPES/KOH 20 mM (pH 7).

Afin de concentrer cette fraction, elle est déposée sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE Trisacryl M<sup>+</sup>, Biosepra Inc.) (débit 7 ml/h) pré-équilibrée dans un tampon HEPES/KOH 20 mM (pH 7). Les protéines sont éluées par l'addition de NaCl 0,5 M dans le même tampon, et collectées dans des fractions de 100 µl. La détection de l'annexine se fait par immunomarquage en utilisant un anticorps dirigé contre l'annexine de maïs (Blackbourn *et al.*, 1991).



**Figure 50. Purification de l'annexine à partir de feuilles et de tiges d'épinard.** L'annexine est purifiée à partir de jeunes feuilles (A, C) et de tiges (B, D) par précipitation sur des phospholipides en présence de calcium et élution par ajout d'EGTA. La fraction purifiée est ensuite concentrée par chromatographie échangeuse d'anions. Les fractions éluées (même volume déposé pour chaque fraction, fractions E1 à E5 pour la purification à partir de feuilles, fractions E1 et E2 pour la purification à partir de tiges) sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (A, B) et par marquage immunologique (C, D) en utilisant un anticorps dirigé contre l'annexine de maïs. L'annexine recombinante étiquetée (Hanx) a été utilisée comme contrôle positif (1 et 2 µg). La protéine étiquetée a une masse moléculaire supérieure à celle de l'annexine native à cause de la présence de la séquence poly-histidine.

## **2. Analyse des protéines obtenues par purification**

La figure 50 (A et B) montre que plusieurs polypeptides sont détectés dans les fractions d'éluion après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes. La position de l'annexine native est indiquée par une étoile. En revanche, les analyses par immunomarquage (figure 50 C et D) montrent la présence d'un seul polypeptide de la taille attendue (35 kDa) dans les fractions d'éluion des deux purifications, à partir de feuilles et de tiges.

La purification de l'annexine native n'est que partielle puisque d'autres protéines sont copurifiées. Ce même profil protéique (présence de protéines copurifiant avec l'annexine) a déjà été obtenu pour les purifications des annexines à partir de plants de persils ou de tissu foliaire de pomme de terre et de tomate (Smallwood *et al.*, 1990). Le rendement des purifications à partir de jeunes feuilles et de tiges semble identique. En général, 200 µg d'annexine sont obtenus à partir de 50 g de matière fraîche (4 µg d'annexine/g de matière fraîche). Lorsque l'annexine est purifiée à partir de feuilles matures d'épinard (feuilles du marché), les quantités d'annexine obtenues sont extrêmement faibles.

## **II. INTERACTION DE L'ANNEXINE AVEC LES CHLOROPLASTES**

### **A. Analyse de la fixation de l'annexine avec les différents lipides de l'enveloppe**

Les annexines se fixent aux phospholipides qui sont les constituants majeurs des membranes extra-chloroplastiques. En revanche, les plastes, et en particulier l'enveloppe, sont majoritairement composés de glycolipides (voir pour revue Douce & Joyard, 1996). Afin de déterminer (a) si l'annexine cytosolique peut interagir avec le chloroplaste et (b) la nature des lipides potentiellement impliqués dans l'interaction de l'annexine avec l'enveloppe, nous avons étudié la fixation de l'annexine sur les lipides des chloroplastes.

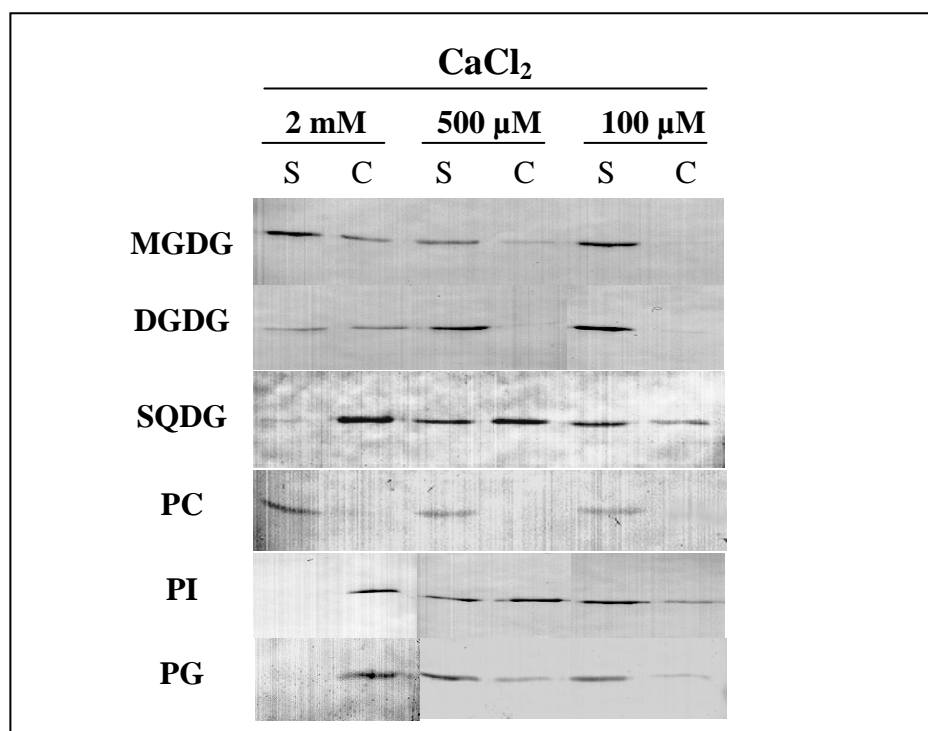
#### **1. Purification des lipides**

Nous avons extrait les lipides selon la méthode de Bligh & Dyer (1959) à partir de chloroplastes intacts et purifiés. Nous avons ensuite purifié les différents lipides par chromatographie liquide sur colonne de silice (voir p. 50), puis par chromatographie sur couche mince de silice. A partir de chloroplastes correspondant à environ 15 mg de chlorophylles, nous avons obtenu 21 mg de MGDG, 37 mg de DGDG et 150 µg de SQDG.

#### **2. Protocole utilisé pour analyser l'interaction de l'annexine avec les différents lipides de l'enveloppe**

Nous avons effectué des tests de liaison de l'annexine sur des vésicules de lipides comme décrit par Boustead *et al.* (1989). Les vésicules de lipides sont préparées en ajoutant 20 µl de tampon EGTA (HEPES/NaOH 20 mM pH 7, KCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 1 mM) à 30 µg de lipides lyophilisés. Nous avons préparé (par sonication 3 fois 10 sec) des vésicules formées uniquement de PC, ainsi que des vésicules renfermant 2 types de lipides (PC/MGDG,

PC/DGDG, PC/SQDG, PC/PI et PC/PG) dans les proportions 1/2 [p/v]. Les vésicules de lipides (30 µg), l'annexine (2 µg) et des concentrations variables de CaCl<sub>2</sub> (pour un volume final de 50 µl) sont incubées pendant 15 min à 20°C, puis centrifugées à 15 000 g pendant 10 min. Des volumes équivalents du surnageant et du culot (repris dans 50 µl de tampon EGTA) contenant les lipides sont ensuite analysés par immunomarquage.



**Figure 51. Interaction de l'annexine native de feuilles d'épinard sur les lipides de l'enveloppe.** L'annexine partiellement purifiée est incubée en présence de vésicules formées uniquement de PC, ou de vésicules renfermant 2 types de lipides (PC/MGDG, PC/DGDG, PC/SQDG, PC/PI et PC/PG) dans les proportions 1/2 [p/v], dans du tampon EGTA contenant diverses concentrations de calcium. Après centrifugation, des proportions équivalentes du surnageant (S) et du culot contenant les vésicules de lipides (C) sont analysées par immunodétection.

### 3. Détermination de la nature des lipides de l'enveloppe susceptibles d'interagir avec l'annexine

La figure 51 montre que la protéine ne s'associe pas aux vésicules composées uniquement de PC, comme cela a déjà été montré pour les autres annexines, même pour des concentrations élevées en calcium (2 mM). En présence de 2 mM calcium, l'annexine est totalement fixée aux vésicules de PC/PI, PC/PG et PC/SQDG et partiellement fixée aux vésicules renfermant du MGDG et du DGDG. L'interaction de l'annexine avec les galactolipides n'est pas observée pour des concentrations plus faibles en calcium. En présence de calcium 500 µM, 50 % de la protéine est fixée aux vésicules de PC/PI, PC/PG et PC/SQDG. Pour une concentration de calcium de 100 µM, environ 40 % de l'annexine se fixe aux vésicules de PC/PI et de PC/SQDG alors que seulement 20 % est fixé aux vésicules de PC/PG. Ces observations montrent que l'annexine purifiée à partir de feuilles se fixe au SQDG (un lipide spécifique des

plastés) et au PI avec une affinité pour le calcium comparable. Ces résultats suggèrent que l'annexine cytosolique est capable d'interagir avec le PI, le SQDG et le PG, lipides présents dans l'enveloppe, pour des concentrations de calcium physiologiques.

## **B. L'annexine se fixe à l'enveloppe du chloroplaste en présence de calcium**

### **1. L'annexine copurifie avec le chloroplaste et l'enveloppe préparés en présence de calcium**

Afin de confirmer l'association *in vivo* de l'annexine avec le chloroplaste, nous avons purifié des chloroplastes et des membranes d'enveloppe en présence de calcium 1 mM. Un traitement des organites ou des membranes par ajout d'EGTA a ensuite été réalisé afin d'éluer les protéines copurifiées de manière calcium dépendante.

#### a. Protocole utilisé pour l'élution de l'annexine à partir des chloroplastes

Les chloroplastes intacts sont purifiés à partir de feuilles de jeunes plants d'épinard (voir p. 42) d'après la méthode de Mourioux (1981). Toutefois, au cours de cette expérience, du  $\text{CaCl}_2$  1 mM final est ajouté à l'ensemble des milieux, l'EDTA est supprimé et le pH est ajusté à 7 au lieu de 7,8. Afin d'éluer les protéines fixées aux chloroplastes de façon dépendante du calcium, les chloroplastes intacts et purifiés sont incubés dans du tampon sorbitol 0,3 M, HEPES/KOH 20 mM (pH 7) contenant de l'EGTA 5 mM pendant 10 min dans la glace. La suspension est ensuite centrifugée pendant 2,5 min à 1500 g, le surnageant est récupéré, dessalé sur une colonne PD10 (Pharmacia) contre du tampon HEPES/KOH 20 mM (pH 7), puis concentré sur une colonne échangeuse d'anions comme décrit p. 139.

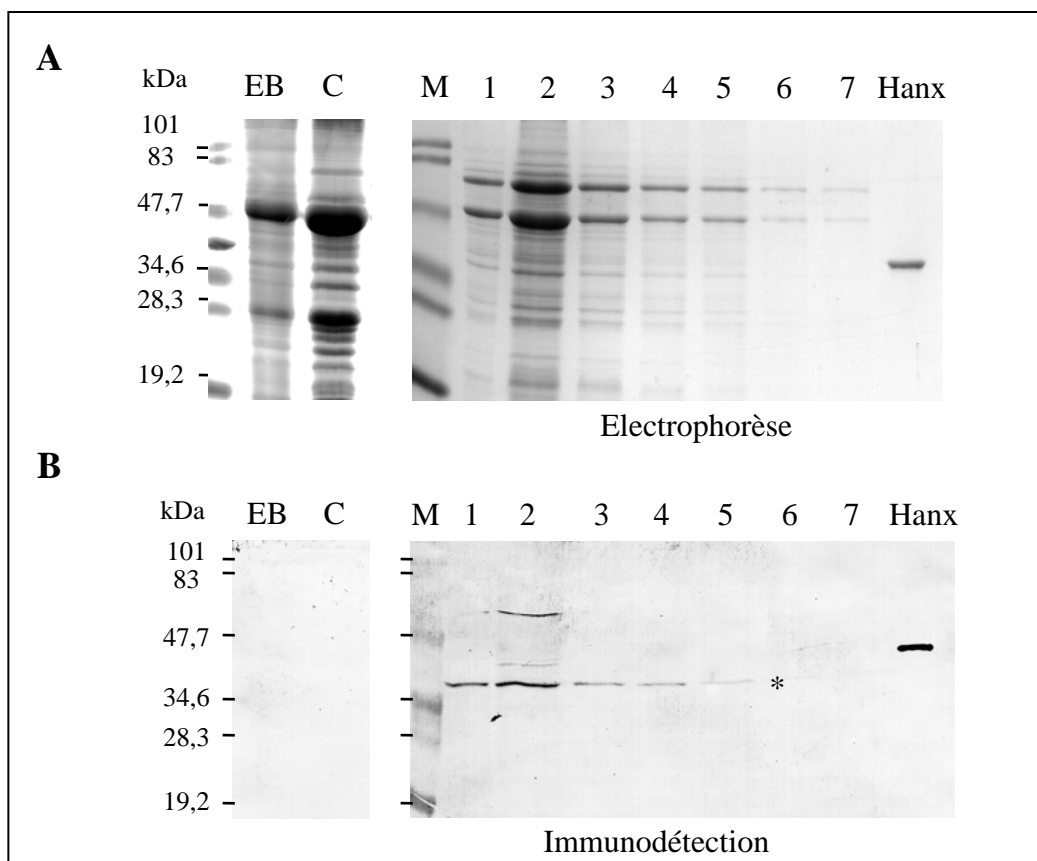
#### b. Protocole utilisé pour éluer l'annexine à partir d'enveloppe

Les membranes d'enveloppe sont obtenues comme décrit dans le paragraphe I D (voir p. 43). Toutefois, au cours de cette expérience, du  $\text{CaCl}_2$  1 mM et des inhibiteurs de protéases sont ajoutés à tous les tampons et le pH est ajusté à 7. L'enveloppe purifiée dans ces conditions est ensuite incubée dans un tampon MOPS/KOH 20 mM (pH 7), EGTA 5 mM pendant 10 min à 4°C, puis centrifugée pendant 1 h à 14 000 g. Des proportions équivalentes du surnageant et du culot (contenant les membranes) obtenus à l'issue de cette centrifugation sont analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'une détection de la protéine par analyse immunologique.

#### c. Analyse des éluions de l'annexine à partir des chloroplastes et d'enveloppe

Les résultats obtenus pour les protéines éluées à partir des chloroplastes purifiés en présence de calcium sont présentés dans la figure 52. L'analyse par séparation électrophorétique (figure 52A) montre la présence de plusieurs polypeptides dans les fractions d'élution (1 à 7). Ils correspondent à des protéines chloroplastiques qui proviennent des quelques pour-cents de chloroplastes cassés au cours de la centrifugation des organites après traitement par l'EGTA.

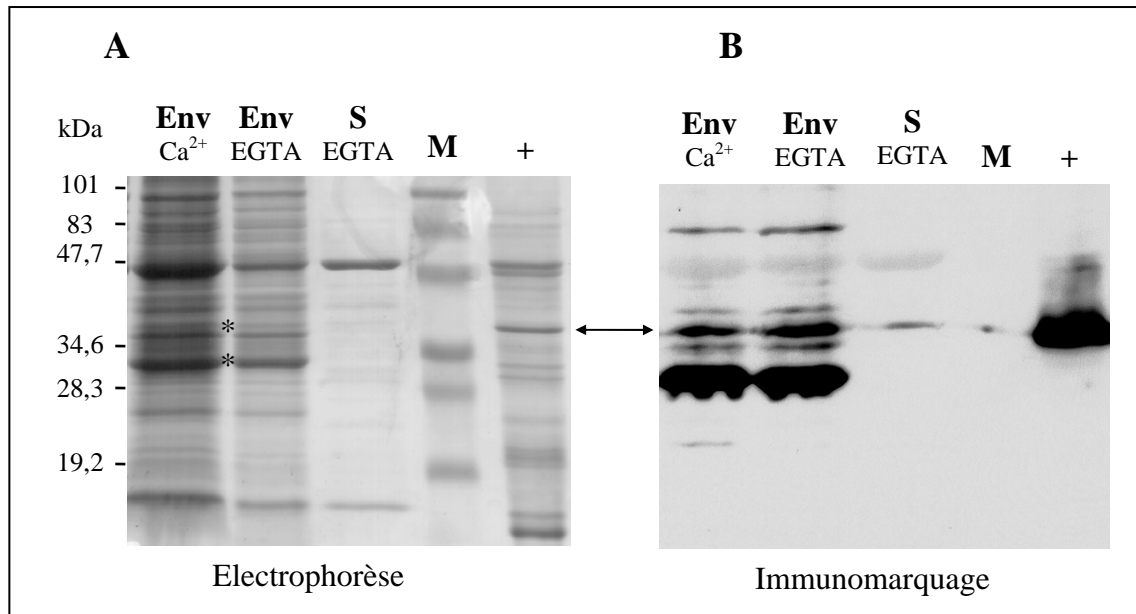
En effet, il est important de rappeler que les chloroplastes intacts et purifiés ne présentent pas de contaminations par des protéines du cytosol (Mourieux & Douce, 1978). La figure 52B montre la présence dans les fractions d'élution d'un polypeptide de 35 kDa révélé par l'anticorps dirigé contre l'annexine. La bande détectée dans la fraction d'élution 2 autour de 60 kDa pourrait correspondre à un dimère d'annexine ou à un marquage non spécifique.



**Figure 52. L'annexine est éluée à partir de chloroplastes purifiés en présence de calcium.** Les chloroplastes sont purifiés en présence de calcium 1 mM puis incubés en présence d'EGTA 5 mM. Après centrifugation, les protéines éluées sont concentrées sur une matrice échangeuse d'anions et les différentes fractions d'élution (E1 à E7, volume déposé identique pour chaque fraction) sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (A) et par immunodétection (B). EB, extrait brut de feuilles d'épinard (50 µg) ; C, chloroplastes (100 µg) ; M, marqueurs de masse moléculaire ; Hanx, annexine recombinante étiquetée (1 µg). L'étoile indique la position de l'annexine native.

La même expérience a été réalisée avec des membranes d'enveloppe purifiées en présence de calcium 1 mM (figure 53). L'annexine est retrouvée dans toutes les fractions étudiées. L'annexine est présente dans l'enveloppe purifiée en présence de calcium 1 mM (fraction Env Ca<sup>2+</sup>) et est éluée par l'ajout d'EGTA (fraction S EGTA). La présence d'annexine dans l'enveloppe après traitement à l'EGTA (fraction Env EGTA) peut s'expliquer par la formation de vésicules d'enveloppe inversées lors du choc osmotique réalisé pour purifier l'enveloppe. D'autre part, il est possible que l'addition d'EGTA 5 mM ne puisse pas éliminer la totalité du Ca<sup>2+</sup> de l'enveloppe (5 µg/mg de protéines d'enveloppe, Joyard & Douce, 1976). Il est

intéressant de noter que les protéines détectées vers 28 kDa par l'anticorps dans les fractions Env Ca<sup>2+</sup> et Env EGTA ne sont pas retrouvées dans la fraction S EGTA. Ces résultats confirment l'association calcium-dépendante et réversible de l'annexine cytosolique avec l'enveloppe du chloroplaste. Il est enfin intéressant de remarquer que la taille de l'annexine détectée et éluée, après traitement de l'enveloppe par l'EGTA, correspond parfaitement à la taille de la protéine ayant été microséquencée (voir figure 45).



**Figure 53. Elution de l'annexine à partir d'enveloppe purifiée en présence de calcium.** La présence de l'annexine est analysée dans les fractions suivantes : Env Ca<sup>2+</sup>, membranes d'enveloppe obtenues à partir de chloroplastes intacts purifiés en présence de calcium 1 mM. Env EGTA, culot de membranes obtenu après incubation de l'env Ca<sup>2+</sup> en présence d'EGTA 5 mM et après centrifugation. S EGTA, protéines éluées par le traitement de l'enveloppe par l'EGTA à partir d'enveloppe purifiée en présence de calcium. +, annexine native de feuilles partiellement purifiée (1,5 µg). La flèche indique la position de l'annexine native. Les différentes fractions sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (A) et par marquage immunologique (B). Noter que la taille de l'annexine native correspond à celle de la protéine IE37 qui avait été séquencée initialement (figure 45). Les étoiles indiquent la position des protéines IE30 (bas) et IE37 (haut).

## 2. Fixation *in vitro* de l'annexine sur des chloroplastes purifiés

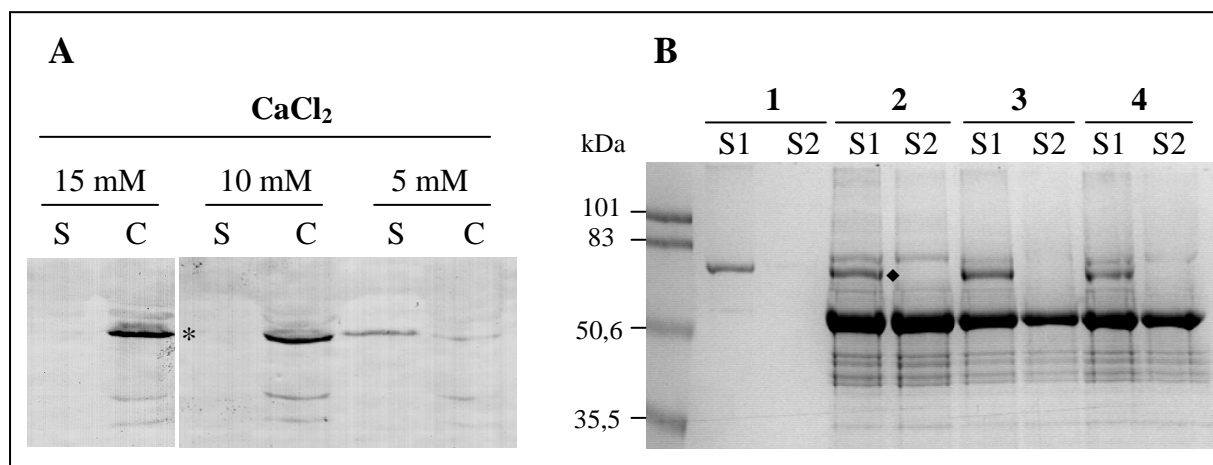
Ayant montré que l'annexine cytosolique peut être extraite à partir de chloroplastes et d'enveloppe purifiés en présence de calcium, nous avons testé la capacité de l'annexine partiellement purifiée à partir de feuilles à interagir avec des chloroplastes intacts et purifiés.

### a. Protocole pour analyser l'interaction de l'annexine avec des chloroplastes intacts et purifiés

Les chloroplastes purifiés sur Percoll (30 µg de chlorophylles) sont incubés en présence de 2 µg d'annexine purifiée dans 50 µl de tampon : sorbitol 0,3 M, HEPES/KOH 20 mM (pH 7) contenant diverses concentrations de CaCl<sub>2</sub>. Après 15 min d'incubation à 20°C, la suspension est centrifugée 2,5 min à 2 500 g. Afin d'éliminer les lipides, les protéines présentes dans le culot sont précipitées par l'addition d'acétone 80 % [v/v], incubation 30 min à -20°C et

centrifugation 15 min à 14 000 g. Le culot obtenu est solubilisé dans du tampon de dépôt 1X (voir p. 45) avant d'être analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes. Des proportions équivalentes du culot et du surnageant obtenus à l'issue de cette étape de centrifugation sont ensuite analysées par marquage immunologique.

L'agrégation des chloroplastes par l'annexine a été testée en utilisant le même protocole. Toutefois, après 15 min d'incubation, l'impact a été analysé par microscopie à contraste de phase et par épifluorescence.



**Figure 54. Interaction de l'annexine native et de la SAB avec des chloroplastes purifiés.** **A.** Interaction de l'annexine native. Les chloroplastes intacts et purifiés sont incubés avec l'annexine en présence de diverses concentrations de calcium (5, 10 et 15 mM). Après centrifugation, les protéines contenues dans le surnageant (S) et le culot (C) sont analysées par immunomarquage. L'étoile indique la position de l'annexine. **B.** Interaction de la SAB. La SAB est incubée dans les milieux suivants, 1 : milieu avec calcium (10 mM), sans chloroplastes, 2 : milieu avec du calcium (10 mM) et des chloroplastes, 3 : milieu ne contenant que des chloroplastes, 4 : milieu contenant des chloroplastes, du calcium (10 mM) et de l'EGTA (30 mM). Après centrifugation, le premier surnageant est récupéré (S1). Les culots de chloroplastes sont lavés dans les mêmes milieux que ceux utilisés pour l'incubation et centrifugés afin de récupérer le deuxième surnageant (S2). Les protéines contenues dans S1 et S2 sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. La SAB est indiquée par le losange.

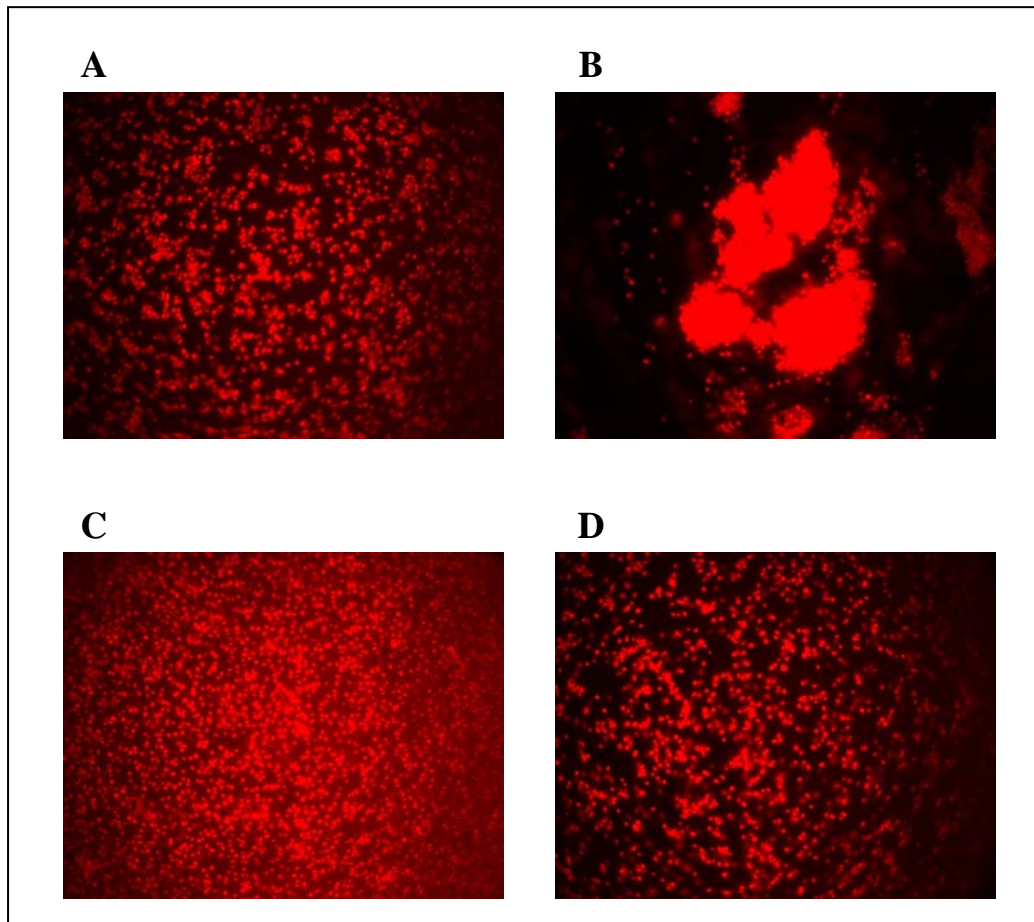
#### b. Analyse de l'interaction *in vitro* de l'annexine avec des chloroplastes purifiés

La figure 54A montre que toute l'annexine est fixée aux chloroplastes pour des concentrations en calcium de 15 mM et 10 mM. En présence de calcium 5 mM, seulement une partie est fixée et aucune fixation n'est détectée pour des concentrations inférieures (non montré). L'association est réversible puisque l'annexine est relarguée dans le milieu en présence d'EGTA (non montré).

Des expériences contrôles ont été effectuées avec de la SAB (sérum albumine bovine), protéine connue pour fixer les lipides et le calcium. La figure 54B montre que la SAB se trouve dans le surnageant dans toutes les conditions testées. Par conséquent, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude de l'interaction de l'annexine native, la SAB ne se fixe pas aux chloroplastes.



Ainsi, bien que la fixation de l'annexine sur des chloroplastes intacts nécessite une forte concentration en calcium, cette interaction semble spécifique. La nécessité d'une concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  aussi élevée pourrait dériver de la capacité de l'enveloppe à fixer de grandes quantités de cations comme le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  (Joyard, 1979). Dans ces conditions, il est probable que seule une faible proportion du calcium fourni sera accessible pour l'interaction de l'annexine avec l'enveloppe du chloroplaste.



**Figure 55.** *L'annexine provoque l'agrégation des chloroplastes en présence de calcium.* Des chloroplastes intacts et purifiés (A) sont incubés en présence de calcium et d'annexine (B), d'annexine seule (C) ou de calcium seul (D). L'agrégation des chloroplastes est observée par microscopie à fluorescence (objectif x 40). La fluorescence observée correspond à celle des chlorophylles.

### c. Agrégation de chloroplastes intacts par l'annexine

Les annexines ont la propriété de provoquer l'agrégation des vésicules de phospholipides *in vitro* en présence de calcium (Creutz, 1992). Nous avons donc testé ce phénomène d'agrégation sur des chloroplastes intacts et purifiés. La fixation de l'annexine sur des chloroplastes purifiés étant totale pour une concentration de calcium de 10 mM, nous avons utilisé la même concentration pour réaliser ce test. L'agrégation est visualisée par microscopie à fluorescence. La figure 55 montre que l'agrégation n'est pas visible en absence d'annexine et

de calcium (figure 55A), ni en présence d'annexine seule (figure 55C) ou en présence de calcium seul (figure 55D). L'agrégation est observée seulement lorsque les chloroplastes sont incubés en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'annexine (figure 55B). L'agrégation est totale en présence de calcium 10 mM et seulement partielle avec du calcium 5 mM.

Nous avons pu observer que dans les conditions de concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'annexine provoquant une agrégation totale, les chloroplastes sont toujours intacts. Cette observation a été confirmée par mesure des capacités de photosynthèse des organites placés dans les mêmes conditions.

### **III. RECHERCHE DU ROLE DE L'ANNEXINE ASSOCIEE A L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES**

#### **1. Impact de l'annexine sur la photosynthèse**

Sachant que l'annexine cytosolique se fixe à l'enveloppe du chloroplaste en présence de concentrations physiologiques de  $\text{Ca}^{2+}$ , nous avons étudié l'impact de cette interaction sur la photosynthèse. Pour cela, nous avons mesuré le dégagement d'oxygène produit par des chloroplastes illuminés en présence de diverses concentrations d'annexine, de calcium et d'EGTA. Les chloroplastes ayant perdu des intermédiaires du cycle de Benson et Calvin lors de la purification, le milieu comprend aussi du phosphate (KPi 100  $\mu\text{M}$ ) et de l'oxaloacétate ou du PGA (à 10 mM). Le carbone inorganique est fourni sous forme de  $\text{NaHCO}_3$  2,5 mM. Dans les différentes conditions testées, c'est-à-dire des combinaisons de différentes concentrations de calcium, d'annexine, d'EGTA, nous n'avons observé aucune modification de la vitesse de dégagement de l'oxygène. Ainsi, dans les conditions testées, l'annexine ne semble pas avoir d'impact sur la photosynthèse. Ce résultat implique aussi que la présence d'annexine sur la face cytosolique de l'enveloppe n'a pas d'impact sur l'intégrité des organites.

#### **2. L'annexine peut-elle former des canaux ioniques ?**

Le calcium dans la cellule végétale a un rôle physiologique clé et la concentration en calcium cytosolique doit être fortement régulée. L'accumulation de calcium dans des endomembranes a été montrée pour le réticulum endoplasmique et pour la vacuole (pour revue voir Barbier-Brygoo *et al.*, 1997). Le chloroplaste pourrait aussi être un réservoir de calcium (Evans *et al.*, 1991). En effet, les chloroplastes contiendraient au total entre 5 et 10 mM de calcium (voir tableau I, p. 7). Des activités de canal calcique ayant été montrées *in vitro* pour certaines annexines animales (Raynal & Pollard, 1994 ; Pollard *et al.*, 1992), nous avons cherché à déterminer si c'était aussi le cas pour l'annexine cytosolique de feuilles. Ce type d'activité n'a jamais été montré ni *in vitro*, ni *in vivo* pour les annexines de plantes. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Fabrice Homblé (Université libre de Bruxelles).

Des bicouches lipidiques planes constituées soit d'asolectine soit d'un mélange 9/1 [p/p] asolectine/POPS (palmitoyl phosphatidylsérine) ont été mises en présence d'annexine

recombinante purifiée. Le POPS assure la présence de 10 % de charges négatives dans la bicouche lipidique plane. Les mesures ont été effectuées dans les milieux suivants : (a) CaCl<sub>2</sub> 100 mM (pH 5), (b) CaCl<sub>2</sub> 100 mM (pH 6,8), (c) CaCl<sub>2</sub> 100 mM, KCl 150 mM (pH 6,8), (d) CaCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 150 mM (pH 7,2). Au cours de chaque expérience, la concentration en annexine a été progressivement augmentée jusqu'à 9 µg/ml. Pour chaque condition expérimentale, une différence de potentiel électrique variant de -100 à +100 mV a été appliquée par pas de 10 mV et pendant une durée de 1 min. Au cours de toutes ces expériences, aucun signal indiquant une activité canal ionique n'a été observé.

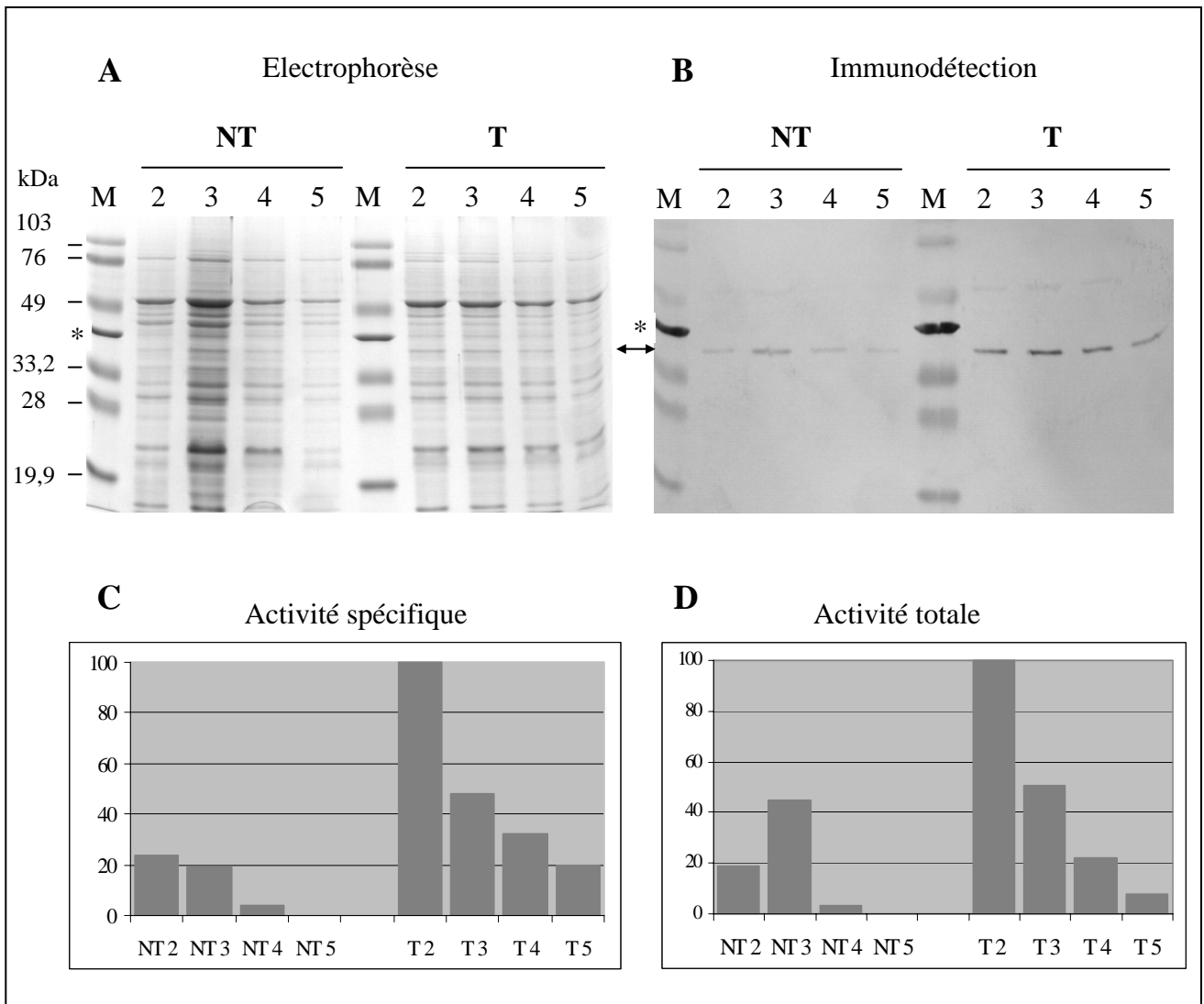
Des expériences similaires dans les bicouches lipidiques planes ont été effectuées avec la protéine native partiellement purifiée. Elles ont été réalisées dans les conditions suivantes : (a) CaCl<sub>2</sub> 100 mM, HEPES 10 mM (pH 7,5), (b) CaCl<sub>2</sub> 50 mM, KCl 50 mM, HEPES 10 mM (pH 7,5), et en augmentant la concentration d'annexine jusqu'à environ 5 µg de protéines/ml. Aucune activité de type canal ionique n'a été détectée. Ces résultats suggèrent que, dans les conditions testées, l'annexine cytosolique de feuilles d'épinard ne forme pas *in vitro* de canal ionique dépendant du voltage.

### 3. L'annexine a-t-elle une activité de type peroxydase ?

En recherchant des gènes de plantes complémentant des mutants d'*Escherichia coli* dépourvus du gène *oxyR* induit en réponse à un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Gidrol *et al.* (1996) ont isolé un ADNc d'*Arabidopsis* correspondant à une isoforme de l'annexine. L'ensemble de leurs résultats suggère que l'annexine pourrait jouer un rôle dans les processus de défense des plantes contre des stress biotiques ou abiotiques. Gidrol *et al.* (1996) ont aussi montré que l'annexine qu'ils avaient identifiée, et qui présentait une grande homologie dans sa partie N-terminale avec des peroxydases, possédait en fait une activité de type peroxydase. L'annexine recombinante que nous avons surexprimée correspondant à la même protéine, nous avons donc recherché ce type d'activité sur l'annexine isolée de feuilles d'épinard (traitées ou non à l'aide de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et sur la protéine recombinante d'*Arabidopsis*.

#### a. Mesure de l'activité peroxydase

L'activité peroxydase est mesurée par détermination de la formation d'un composé oxydé. Pour cela, nous avons utilisé les deux substrats suivant : l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le guaiacol. Le guaiacol est incolore et prend une teinte orangée lorsqu'il est oxydé. L'oxydation de ce composé est suivie au spectrophotomètre par lecture de l'absorbance à 470 nm. Dans une cuve de spectrophotomètre, la protéine étudiée est mélangée avec du guaiacol 5 mM dans 1 ml de tampon HEPES/KOH 25 mM (pH 7). De l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM est ajouté, et l'activité peroxydase est immédiatement suivie par lecture de l'absorbance à 470 nm ( $\epsilon_{\text{(guaiacol)}} = 26,6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ). La peroxydase de radis noir (Sigma) est utilisée comme contrôle positif.



**Figure 56. Impact de l' $H_2O_2$  sur l'expression de l'annexine. Mesure de l'activité peroxydase dans les fractions enrichies en annexine.** L'annexine est purifiée à partir d'une même quantité de tissus provenant de jeunes plants d'épinard traités soit avec de l'eau (non traité, NT) soit avec du  $H_2O_2$  1 mM (traité, T) et récoltés 60 h après le traitement. Les différentes fractions d'éluat (2 à 5, volume déposé identique pour chaque fraction) contenant la protéine purifiée sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (A) et par immunodétection (B).

L'annexine native et l'annexine recombinante étiquetée sont indiquées respectivement par la double flèche et par l'étoile. Dans chacune de ces fractions, l'activité peroxydase a été testée. Elle est exprimée en % par rapport à la fraction contenant l'activité maximale (T2, 100%). Activité peroxydase spécifique de la fraction T2 = 0,64  $\mu$ moles/h/mg de protéines (protéines totales de la fraction). C, activité peroxydase spécifique. D, activité peroxydase totale de la fraction (activité de la fraction T2 = 20,5 nmoles/h).

#### b. Analyse des mesures d'activité peroxydase

Dans une première étape, nous avons analysé l'activité de l'annexine recombinante et nous ne sommes pas parvenus à mesurer d'activité peroxydase dans ces préparations (résultats non montrés). Dans sa partie *N*-terminale, l'annexine présente une bonne homologie avec un domaine des peroxydases impliqué dans la fixation des hèmes (Gidrol *et al.*, 1996). Nous avons cherché à visualiser la présence éventuelle d'un tel groupement dans l'annexine

recombinante par spectrophotométrie. Les spectres d'absorption (entre 250 et 650 nm) que nous avons réalisés ont montré que l'annexine recombinante ne contient pas d'hème (non montré).

Pensant que l'absence de l'hème dans l'annexine recombinante pouvait être responsable de l'absence d'activité de la protéine, nous avons préparé de l'annexine native, purifiée à partir de feuilles, et mesuré son activité peroxydase. Nous n'avons détecté qu'une très faible activité peroxydase dans les fractions d'annexine partiellement purifiée. Cette activité est 200 à 500 fois plus faible que celle de l'enzyme contrôle (peroxydase de radis noir) dans les mêmes conditions. Or Gidrol *et al.* (1996) ont montré que l'annexine native d'*Arabidopsis* ainsi que la protéine recombinante possèdent une activité spécifique peroxydase équivalente à celle de la peroxydase de radis noir. Nous avons aussi vérifié l'absence de substances inhibitrices dans nos fractions et démontré que le milieu utilisé pour éluer l'annexine native purifiée n'inhibe pas l'activité de la peroxydase contrôle, pas plus que les autres protéines qui copurifient avec l'annexine.

Gidrol *et al.* (1996) ont montré que l'expression de l'annexine augmentait après un traitement des plants à l' $H_2O_2$ . Nous avons donc traité de jeunes plants d'épinard avec de l' $H_2O_2$  1 mM. L'expérience contrôle est réalisée en traitant les jeunes plants avec de l'eau. 60 heures après le traitement, les feuilles ont été découpées et l'annexine a été purifiée à partir des deux lots de feuilles (traité et contrôle). Des analyses par électrophorèse en conditions dénaturantes, immunomarquage (anticorps dirigés contre l'annexine), et des tests d'activité de type peroxydase ont été effectués pour chacune des fractions d'élution. D'après l'analyse par immunodétection (figure 56B), il semblerait que la quantité d'annexine obtenue à partir des feuilles traitées à l' $H_2O_2$  soit effectivement plus importante que celle obtenue avec les feuilles témoins. Les tests d'activité peroxydase (figures 56 C et D) semblent montrer aussi une augmentation de l'activité dans les feuilles traitées à l' $H_2O_2$  bien que cette activité reste faible par rapport à celle de la peroxydase de radis noir. En effet, si l'on compare l'activité mesurée (en moles/h/mg protéines) de l'annexine contenue dans la fraction T2 et des protéines totales de la fraction T2 par rapport à l'activité de la peroxydase contrôle, on obtient respectivement des activités 260 et 8400 fois plus faibles que le contrôle (tableau IX).

Cependant, nous avons observé que l'activité peroxydase des différentes fractions d'élution diminue alors que la quantité d'annexine dans ces mêmes fractions reste constante (figure 56). Ainsi, après traitement à l'eau oxygénée, s'il y a effectivement une augmentation de l'expression de l'annexine et de l'activité peroxydase, cette activité peroxydase détectée n'est pas corrélée à la présence de l'annexine dans les différentes fractions d'élution. D'autre part, il est possible que l'augmentation de l'activité peroxydase et de la quantité d'annexine n'aient rien à voir avec le traitement à l' $H_2O_2$ . En effet, on ne peut pas exclure un rendement de purification meilleur lorsque l'on a utilisé les feuilles traitées à l' $H_2O_2$ .

Nos résultats suggèrent donc que l'annexine n'a pas d'activité peroxydase, et nous n'avons donc pas été en mesure de confirmer les résultats de Gidrol *et al.* (1996).

Fractions analysées	Activité µmoles/h/mg protéines	Activité contrôle/activité protéines testées
Peroxydase de radis noir	5400	-
Fraction T2		
- activité exprimée par rapport à la totalité des protéines de la fraction T2	0,64	8437
- activité exprimée par rapport à la quantité d'annexine présente dans la fraction T2	20,5	263

**Tableau IX. Activité peroxydase associée aux fractions enrichies en annexine purifiée.** L'activité peroxydase est mesurée pour la peroxydase de radis noir (contrôle positif) et pour la fraction d'éluion T2 (voir figure 56). Le rapport activité contrôle/activité protéines testées permet d'estimer l'activité peroxydase des protéines par rapport au contrôle.

## IV. DISCUSSION - CONCLUSION

### A. L'annexine cytosolique de feuilles d'épinard se lie au chloroplaste

Chez les mammifères, les annexines sont présentes dans la plupart des membranes cellulaires (Gruenberg & Emans, 1993). Par exemple, les isoformes V et VI sont associées à la mitochondrie (Rainteau *et al.*, 1995 ; Sun *et al.*, 1993), l'annexine XI dans les fibroblastes est localisée dans le noyau (Mizutani *et al.*, 1992). Les annexines ne sont pas associées de façon permanente aux membranes, certaines conditions cellulaires (comme une augmentation du calcium intracellulaire) sont nécessaires à la fixation des annexines. Chez les plantes, les annexines ont été isolées à partir de nombreuses espèces et de tissus différents en utilisant leur capacité à se fixer sur les phospholipides en présence de calcium (Clark & Roux, 1995). Les annexines identifiées ont une masse moléculaire comprise entre 33 et 35 kDa avec deux exceptions, l'annexine de céleri de 42 kDa (Seals *et al.*, 1994) et l'annexine de fougère de 70 kDa (Clark *et al.*, 1995). Des études d'immunolocalisation des annexines de plantes montrent des associations de ces protéines avec le plasmalemme, le Golgi et les vésicules dérivant du Golgi dans les plumules de pois (Clark *et al.*, 1992). Chez le céleri, l'annexine de 42 kDa est associée à la membrane vacuolaire (Seals *et al.*, 1994). Récemment, une localisation nucléaire a été identifiée pour l'annexine AnnMs2 de luzerne (Kovács *et al.*, 1998). Ainsi, dans les cellules végétales, les annexines interagiraient avec la plupart des systèmes membranaires (Clark & Roux, 1995). Cependant, à notre connaissance, l'association de l'annexine avec les membranes des plastes, et avec l'enveloppe des plastes en particulier, n'a jamais été analysée.

Nous avons purifié l'annexine à partir de feuilles et de tiges de jeunes plants d'épinard, les rendements d'extractions sont de l'ordre de 4 µg d'annexine/g de matière fraîche. Sachant qu'un gramme de matière fraîche contient approximativement 15 mg de protéines, nous avons estimé la quantité d'annexine purifiée à 0,03 % des protéines totales, soit 3 à 10 fois moins

qu'il était théoriquement possible d'obtenir. En effet, Clark & Roux (1995) estiment que les annexines représentent en général 0,1 à 0,3 % des protéines totales.

L'ensemble de nos résultats montre que quelles que soient les conditions expérimentales, nous retrouvons de l'annexine associée à l'enveloppe. En effet, nous avons caractérisé l'annexine sur de l'enveloppe isolée préparée dans des conditions standard, c'est-à-dire à partir de chloroplastes intacts, purifiés sur Percoll (sans  $\text{Ca}^{2+}$  dans les milieux). Nous avons aussi été capables d'extraire de l'annexine à partir de chloroplastes isolés en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi qu'à partir d'enveloppe purifiée. Or, la purification de chloroplastes sur gradients isopycniques de Percoll élimine tous les contaminants cytosoliques (Pineau *et al.*, 1979 ; Joyard *et al.*, 1982). Enfin, l'addition d'annexine, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , à une suspension de chloroplastes intacts provoque leur agglutination. L'annexine cytosolique interagit donc avec la face cytosolique de l'enveloppe du chloroplaste, en présence de calcium, et cette interaction est réversible (figures 52 et 53). D'après ces observations, nous pouvons conclure que (a) l'association de l'annexine avec le chloroplaste est physiologiquement possible, et que (b) les membranes d'enveloppe constituent *in vivo* un site de forte affinité pour la fixation de l'annexine.

### **B. L'annexine peut se fixer sur le sulfoquinovosyldiacylglycérol, un glycolipide spécifique des plastes**

Les annexines sont des protéines qui se fixent sur les phospholipides de manière calcium dépendante. Elles interagissent avec les phospholipides acides comme le PA, le PI et la PS avec une très forte affinité. Certaines annexines se fixent à des phospholipides neutres comme la PE mais l'interaction n'est jamais détectée pour la PC et la sphingomyéline (Raynal & Pollard, 1994). Par la présence de galactolipides (MGDG, DGDG) et du SQDG, et l'absence de certains phospholipides (PE et PS), la composition des membranes de plastes est très différente de celle des membranes extrachloroplastiques (tableau X). De plus, comme toutes les membranes biologiques, la membrane externe de l'enveloppe est structurellement et fonctionnellement asymétrique. D'une part, la quasi totalité de la phosphatidylcholine (PC) chloroplastique est localisée sur le feuillet externe de la membrane externe de l'enveloppe (Dorne *et al.*, 1985). Ainsi, la face cytosolique de l'enveloppe renferme essentiellement un phospholipide qui ne fixe pas l'annexine. D'autre part, le phosphatidylglycérol (PG), un phospholipide capable de fixer l'annexine, n'est pas accessible sur la face externe de la membrane de l'enveloppe (Dorne *et al.*, 1985), et ne peut donc pas interagir avec l'annexine cytosolique. On ignore la répartition exacte, au sein de la membrane externe de l'enveloppe, du phosphatidylinositol (PI), phospholipide pouvant interagir avec l'annexine. Mais il est probablement distribué comme la PC. Utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les glycolipides spécifiques du plaste, Billecocq *et al.* (1972) et Billecocq (1974, 1975) ont montré que le MGDG, le DGDG et le SQDG (ou sulfolipide) étaient accessibles sur la face externe de la membrane externe. Ainsi, les seuls lipides de l'enveloppe connus pour être

présents dans le feuillet externe de la membrane externe sont la PC (et probablement le PI), et les lipides spécifiques du plaste (MGDG, DGDG, sulfolipide). A notre connaissance, l'interaction de l'annexine avec ces trois glycolipides n'avait jamais été rapportée.

	Composition lipidique				% d'annexine fixée pour une concentration déterminée en Ca <sup>2+</sup>	
	Mitochondries (a) (feuilles de pois)	Chloroplastes (feuilles d'épinard) (b)			Annexine de feuilles d'épinard (ce travail)	Autres annexines de plantes
		Totaux	Enveloppe	ME		
MGDG	-	52	32	17	50 % - 2 mM	nt
DGDG	-	26	30	29	50 % - 2 mM	nt
SQDG	-	6.5	6	6	<b>40% - 100 µM</b>	nt
PC	40	4.5	20	32	pas d'interaction	pas d'interaction (c) - (d) - (e)
PG	2	9.5	9	10	<b>20 %- 100 µM</b>	10 % - 1 mM (d)
PE	46	0	0	0	nt	100 % - 1 mM (c) pas d'interaction (d)
DPG	14	0	0	0	nt	nt
PI	6	1.5	4	5	<b>40 % - 100 µM</b>	100 % - 1 mM (c) - (d)
PS	-	-	-	-	nt	50 % - 120 µM (c) 50 % - 330 µM (c) 50 % - 550 µM (d) 100 % - 1 mM (e)

**Tableau X : Composition lipidique des membranes de mitochondries et de chloroplastes, affinité de plusieurs annexines pour différents lipides.** Les compositions lipidiques ont été décrites par (a) Day *et al.*, 1985 ; et (b) Block *et al.*, 1983b. Elles sont exprimées en pourcentage des lipides totaux.

Les valeurs de pourcentage d'annexine fixée en fonction des concentrations de calcium sont issues de la littérature pour les annexines suivantes : (c) annexines de maïs p33 et p35 (Blackbourn *et al.*, 1991), (d) annexine de poivron vert p35 (Hoshino *et al.*, 1995), (e) annexines de tomate p33 et p35 (Boustead *et al.*, 1989). ME : membrane externe. MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, SQDG : sulfoquinovosyl diacylglycérol, PC : phosphatidylcholine, PG : phosphatidylglycérol, PI : phosphatidylinositol, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidyl sérine. DPG : diphosphatidylglycérol. nt : non testé.

Nos résultats (figure 52, p. 144) montrent que l'annexine cytosolique interagit, à des concentrations de calcium physiologiques, avec le PI, le sulfolipide et le PG. Sachant que le PG n'est pas présent dans le feuillet externe de la membrane externe, le sulfolipide, et



probablement le PI, sont les seuls lipides de la membrane externe de l'enveloppe susceptibles d'interagir spécifiquement avec l'annexine. Le sulfolipide est un lipide anionique, comme le PA, PS et PI, lipides sur lesquels se fixent préférentiellement les annexines. La concentration en calcium nécessaire pour fixer 40 % de l'annexine sur le sulfolipide est de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  libre comme pour le PI. Cette valeur correspond à celles obtenues pour les autres annexines (tableau X). En effet, les annexines de maïs fixent à 50 % des liposomes en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  150  $\mu\text{M}$  (Blackbourn & Battey, 1993). Des valeurs d'affinité de l'ordre du nM ont été obtenues pour la fixation de l'annexine VCaB42 sur le tonoplaste (Seals *et al.*, 1994). Cependant, dans ce cas précis, la technique de détermination de la concentration de calcium nécessaire pour la fixation était différente. En effet, les vacuoles étaient purifiées en présence de calcium 1 mM, puis la dissociation de l'annexine était provoquée par ajout de concentrations croissantes d'EGTA. L'affinité était alors déduite de la concentration d'EGTA nécessaire au relargage de l'annexine. Dans tous les autres cas, l'affinité est déduite du pourcentage de protéine fixée sur des vésicules de lipides en présence de concentrations variables de calcium. L'annexine cytosolique de feuilles est donc capable de se fixer au chloroplaste dans des conditions physiologiques, via le sulfolipide et probablement le PI.

### C. Quel rôle pour l'annexine dans le chloroplaste ?

Les annexines tant animales que végétales semblent être impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques. Les annexines de plantes seraient en particulier impliquées dans des processus sécrétoires (Blackbourn *et al.*, 1992). En effet, les annexines de maïs sont capables de se fixer et d'agréger des vésicules sécrétrices pour des concentrations de calcium libre de 150  $\mu\text{M}$  (Clark & Roux, 1995 ; Potikha & Delmer, 1997). L'annexine identifiée chez le céleri serait impliquée dans les processus de signalisation calcique dans la vacuole (Seals *et al.*, 1994). Chez le coton, une annexine serait impliquée dans la régulation de la callose synthase, une enzyme localisée dans la membrane plasmique (Andrawis *et al.*, 1993). Des études sur les annexines de tomate ont montré que les annexines p34 et p35 interagissent spécifiquement avec l'actine F mais pas avec l'actine G pour des concentrations de calcium de 100-300  $\mu\text{M}$  (Calvert *et al.*, 1996). Certaines annexines de plante possèdent une activité nucléotide phosphodiesterase comme l'annexine de maïs qui est associée à une ATPase (Mc Clung *et al.*, 1994). Les annexines de tomate catalysent aussi l'hydrolyse d'une grande variété de nucléotides di et triphosphates, une réaction qui ne nécessite pas de cations divalents et qui est inhibée par les phospholipides (Calvert *et al.*, 1996). Un certain nombre de travaux proposent un rôle des annexines chez les plantes lors de leur interaction avec les microorganismes, phytopathogènes (Gidrol *et al.* 1996) ou symbiotiques (de Carvalho-Niebel *et al.*, 1998). Globalement, les annexines seraient surexprimées en condition de stress biotique ou abiotique. Ainsi, Kovács *et al.* (1998) ont montré que l'expression de l'annexine de luzerne AnnMs2 augmente lors de stress qui modifie l'état osmotique de la cellule comme une

déshydratation ou des traitements au NaCl, au PEG, au mannitol. Ils proposent que l'AnnMs2 puisse fonctionner comme un canal ionique et aurait alors un rôle potentiel dans la régulation osmotique de la cellule en laissant passer des ions ou de l'eau.

Nous avons donc cherché à déterminer si l'annexine de feuilles d'épinard pouvait fonctionner comme un canal ionique dans l'enveloppe. Pour cela, l'annexine recombinante d'*Arabidopsis* ou l'annexine native d'épinard ont été insérées dans des bicouches lipidiques planes. Les courants ont ensuite été mesurés à travers cette membrane dans différentes conditions (concentrations en calcium, concentrations en protéines, variations de la différence de potentiel). Dans toutes les conditions testées, aucun signal indiquant une activité canal ionique n'a été détecté. Ainsi, l'annexine cytosolique de feuilles d'épinard ne forme pas *in vitro* de canal ionique voltage dépendant. Cette activité canal ionique n'a jamais été montrée *in vitro* ni *in vivo* pour les annexines de plante, ce qui n'exclut pas une activité de ce type pour d'autres annexines de plante. Il faut noter cependant que le système utilisé pour ces expériences ne permet pas de mettre en évidence des canaux ayant une conductance inférieure à 20 pS. Ainsi, si l'annexine forme un canal de conductance plus faible, il ne pourra pas être détecté. Les conductances déterminées *in vitro* pour les annexines animales formant des canaux ioniques sont de l'ordre de 30 pS (dans des solutions symétriques contenant 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) pour l'annexine V (Burger *et al.*, 1994) et d'environ 26 pS (en présence de 25 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) pour l'annexine VII (Pollard & Rojas, 1988).

Par ailleurs, Gidrol *et al.* (1996) ont proposé qu'une annexine d'*Arabidopsis* aurait une activité peroxydase. Son expression augmenterait après un traitement à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou à l'acide salicylique. Le fait que l'annexine associée à l'enveloppe soit très homologue à la protéine d'*Arabidopsis* décrite par Gidrol *et al.* (1996) nous a conduit à mesurer cette activité sur la protéine recombinante d'*Arabidopsis* et sur des fractions enrichies en annexine native isolée de l'épinard. Nous n'avons pas trouvé d'activité peroxydase associée à la protéine d'*Arabidopsis* surexprimée sous forme de fusion, ni détecté d'hème associé à cette protéine, comme cela était supposé (par homologie de séquences) par Gidrol *et al.* (1996). D'autre part, si nous mesurons effectivement une activité peroxydase qui copurifie avec l'annexine native de feuilles d'épinard, cette activité est extrêmement faible. Cette activité augmente après un traitement à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  mais n'est pas corrélée à la présence de l'annexine dans les fractions purifiées. Nos résultats suggèrent donc que l'annexine cytosolique de feuilles n'a pas d'activité peroxydase.

Enfin, l'association de l'annexine cytosolique au chloroplaste suggère un rôle potentiel dans des processus de signalisation intracellulaire impliquant le calcium. En effet, comme second messager, le calcium joue un rôle clé dans le développement et la croissance de la plante. De tels processus impliquent en particulier une coordination très étroite entre le développement des plastides et la différenciation cellulaire afin d'assurer une expression coordonnée des

génomés nucléaires et plastidiaux (voir par exemple Sato *et al.*, 1999). Cette coordination nécessite des échanges de signaux entre les plastes et le noyau. La situation de l'enveloppe, à l'interface entre le cytosol et le chloroplaste, en fait potentiellement un site privilégié pour contrôler les échanges des molécules régulatrices qui participent à cette expression coordonnée entre génomes. Lors des processus de signalisation par le calcium, d'autres molécules agissant en aval sont alors nécessaires pour obtenir une réponse physiologique. Ces molécules sont en général des protéines qui fixent le calcium, comme la calmoduline et les protéines kinases calcium-dépendante (Bethke *et al.*, 1995). En se fixant aux lipides de la membrane externe de l'enveloppe en présence de calcium, l'annexine cytosolique pourrait ainsi participer à des processus de signalisation calcique impliquant les plastes, une situation semblable à celle qui a été suggérée pour l'annexine VCaB42 associée à la vacuole (Seals *et al.*, 1994).



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'enveloppe des plastes constitue un site privilégié de transport de métabolites, d'ions, de protéines et d'informations entre les plastes et leur environnement. De nombreux systèmes de transport sont donc présents dans l'enveloppe (figure 2). Néanmoins, malgré leur importance physiologique pour l'ensemble des processus métaboliques cellulaires, très peu d'entre eux ont été identifiés au niveau moléculaire.

Notre travail avait pour objectif de mettre au point des stratégies permettant d'identifier, tant au plan moléculaire que fonctionnel, de nouvelles protéines de l'enveloppe pouvant potentiellement être impliquées dans des systèmes de transport (canaux ioniques, transporteurs, pompes, etc...). Les principales barrières à l'identification de telles protéines sont leur faible représentation dans l'enveloppe et leur intégration au sein de membranes très riches en lipides. Les approches expérimentales généralement utilisées, par exemple les approches de type PCR, pour étudier les transporteurs ou canaux de membranes comme les membranes plasmique ou vacuolaire ne sont pas appropriées dans notre cas. En effet, les protéines de l'enveloppe déjà connues présentent peu d'homologies avec les protéines d'autres systèmes membranaires. La complémentation de mutants de levure, qui a permis l'identification de nombreux transporteurs de la membrane plasmique, n'a encore jamais permis le clonage d'un transporteur localisé dans les chloroplastes.

La stratégie globale qui a guidé notre travail est présentée dans la figure 8. Elle comprend deux aspects complémentaires. Dans une première étape, nous avons cherché à identifier de nouvelles protéines de l'enveloppe potentiellement impliquées dans des systèmes de transport. Nous avons ensuite cherché à déterminer leur fonction en utilisant en particulier des stratégies de génétique inverse.

Les protéines membranaires catalysant des fonctions de transport présentent des domaines transmembranaires hydrophobes qui leur confèrent des propriétés de solubilité dans certains solvants organiques. La première étape de notre travail a donc consisté à mettre au point les conditions d'*extraction, par des mélanges chloroforme/méthanol, des protéines les plus hydrophobes* de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard. Plusieurs paramètres ont été étudiés comme la valeur des rapports solvants organiques/protéines, les proportions entre chloroforme et méthanol, ou les conditions d'électrophorèse. L'analyse des fractions obtenues par *électrophorèse en conditions dénaturantes* révèle qu'au moins une vingtaine de protéines différentes sont extraites par ces mélanges. Ces protéines ont ensuite été analysées par microséquençage. Couplée à l'utilisation de *techniques protéomiques particulièrement performantes* (en particulier le microséquençage par spectrométrie MS/MS), la séparation des

protéines en conditions dénaturantes s'est révélée particulièrement utile pour l'ensemble de l'approche protéomique, en particulier en présence de fortes concentrations de SDS. De nombreuses séquences *N*-terminales et internes ont ainsi été obtenues, correspondant pour certaines à des protéines déjà connues (IE30, le transporteur de phosphate/triose phosphate ; IE37, une méthyltransférase dépendante de la *S*-adénosylméthionine ; IE45, le transporteur d'oxoglutarate/malate) et pour d'autres à des protéines non encore décrites (en particulier IE16 et IE18). Ces protéines sont toutes hydrophobes et localisées dans l'enveloppe du chloroplaste, certaines d'entre elles sont en fait présentes en très petite quantité dans l'enveloppe et présentent un point isoélectrique basique. Nous avons aussi montré la présence dans l'enveloppe d'une protéine déjà connue par ailleurs, l'annexine, mais dont on ne soupçonnait pas la présence dans les chloroplastes. Les résultats obtenus montrent aussi l'intérêt d'utiliser ***des fractions membranaires les plus pures possible et bien caractérisées.***

La seconde étape du travail a consisté à tenter de caractériser la fonction de nouvelles protéines identifiées, IE16 et IE18, en mettant en œuvre des approches de ***bioinformatique***, des approches de ***génétique inverse*** et des approches ***biochimiques***.

Les recherches d'homologies de séquences sur des banques génomiques et des banques d'EST d'*Arabidopsis* nous ont permis de cloner des ADNc d'*Arabidopsis* correspondant aux protéines IE16 et IE18 d'épinard. D'autre part, des homologues des protéines IE16 et IE18 ont été identifiés chez les algues vertes, les algues rouges et les procaryotes (en particulier chez *Synechocystis*). Ces homologues présentent des homologies avec des systèmes de transport procaryotes, ce qui est en accord avec des fonctions putatives de transporteurs pour les protéines IE16 et IE18.

Nous avons ensuite préparé des mutants de *Synechocystis* et d'*Arabidopsis*. Les mutants de *Synechocystis* ont été obtenus par insertion d'une cassette dans le gène d'intérêt homologue de IE16 (*sll1737*) et IE18 (*slr0789*). Seul le mutant du gène homologue à *ie18* ( $\Delta$ slr0789) a pu être obtenu pour l'instant. Ce mutant ne présente pas de phénotype particulier dans les conditions normales de croissance. En revanche, il semble affecté par des variations de concentrations salines et de pH. Dans ces conditions, l'analyse du phénotype du mutant  $\Delta$ slr0789 suggère qu'il pourrait être affecté dans un système de transport des cations, et plus particulièrement de  $K^+$  et/ou de  $H^+$ .

En parallèle, nous avons criblé par PCR la banque d'insertion d'*Arabidopsis thaliana* de l'INRA de Versailles. Nous avons obtenu deux mutants pour le gène *ie18* (ACE3 et ABH11) et deux mutants pour le gène *ie16-1* (ABC9 et DIF6). Le mutant DIF6 a une insertion de l'ADN-T dans la partie 3' non codante du gène *16-1*, cette insertion ne semble pas affecter l'expression de la protéine IE16-1. Les analyses de ces mutants sont en cours actuellement. Les premières observations montrent que les mutants du gène *ie18* ne présentent pas de phénotypes apparents dans les conditions standard de culture. En revanche, 25 % des plantes

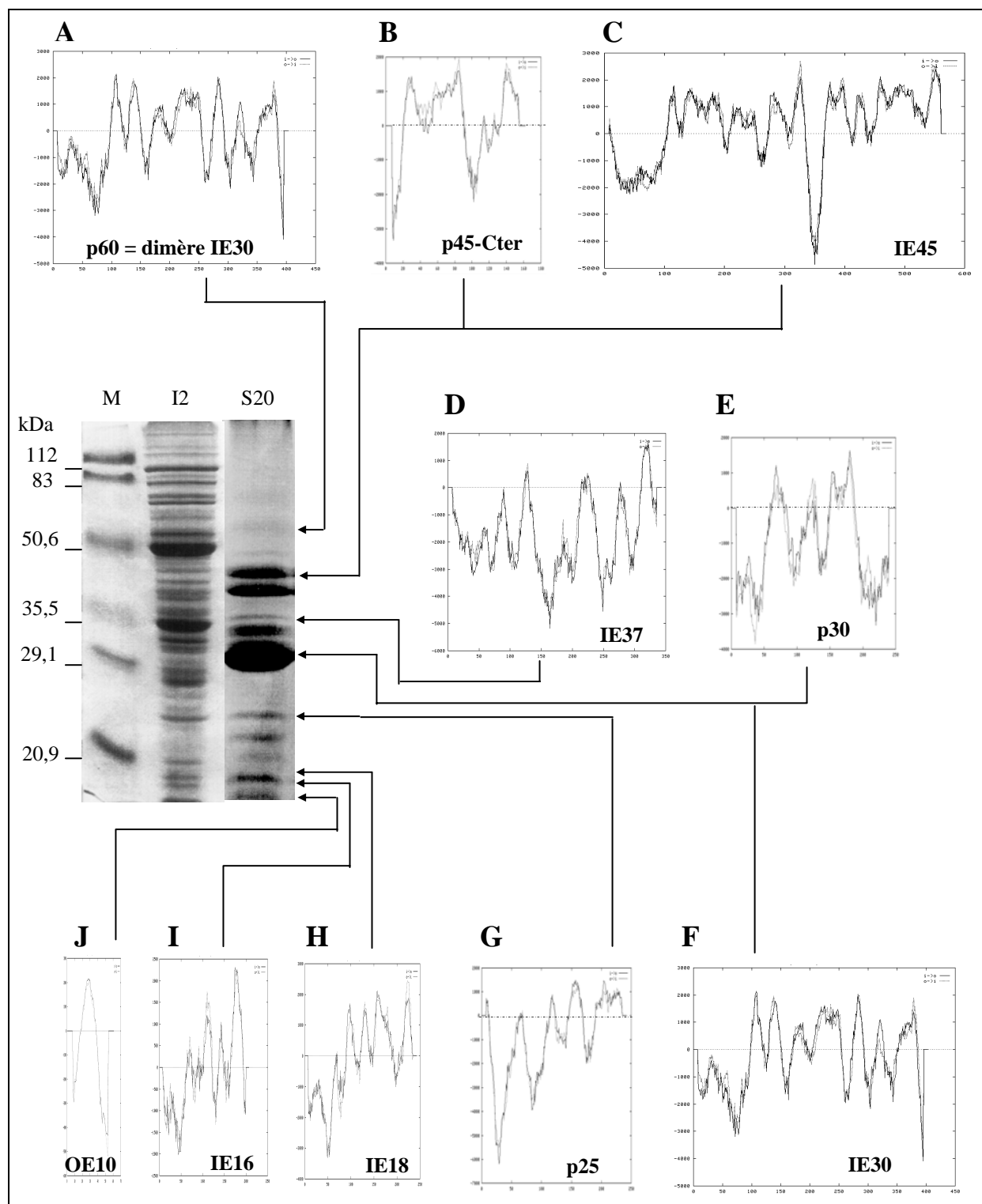
ABC9 sont affectées dans leur croissance : après apparition des deux premiers cotylédons, la plantule blanchit et meurt. Le génotype de ces plantules pour le gène *ie16-1* doit être confirmé. Les analyses de ces mutants vont être poursuivies, notamment en faisant varier les conditions de culture. L'ensemble des informations apportées par les mutants de cyanobactéries et d'*Arabidopsis* sont ensuite utilisées pour orienter les analyses biochimiques sur les protéines.

Dans une dernière étape, nous avons entrepris d'exprimer en particulier les protéines IE16 et IE18 dans des systèmes hétérologues. Il était en effet indispensable d'obtenir ces protéines en quantité suffisante pour des analyses biochimiques et fonctionnelles. Le système procaryote *E. coli* n'a pas permis l'expression de ces protéines, qui sont probablement toxiques pour la bactérie. En revanche, les protéines sont exprimées dans le système d'expression eucaryote cellules d'insecte/baculovirus. Les premières analyses sur ces protéines montrent qu'elles forment des homodimères, comme le transporteur de phosphate/triose phosphate (Flügge *et al.*, 1998) ou les canaux OEP16 et OEP24 de l'enveloppe (Polhmeyer *et al.*, 1997, 1998) qui forment des homodimères *in situ*. Les membranes de cellules d'insecte contenant les protéines exprimées ont été insérées dans des bicouches lipidiques, et l'analyse électrophysiologique est en cours. Les recherches des fonctions de ces protéines sont orientées par les analyses des phénotypes des mutants. Ainsi, dans un premier temps, l'analyse fonctionnelle de la protéine IE18 est orientée vers la mesure de flux de  $K^+$  et de  $H^+$ .

Parmi les protéines nouvellement identifiées, l'annexine est un bon exemple de l'intérêt de la stratégie mise en œuvre. C'est une nouvelle protéine, aux propriétés remarquables, que nous avons caractérisée dans l'enveloppe par une stratégie protéomique. Aucun des travaux réalisés auparavant sur cette protéine n'avait suggéré une association spécifique de cette protéine avec l'enveloppe du chloroplaste. L'affinité de l'annexine pour le sulfolipide est très intéressante, car elle montre pour la première fois qu'un lipide autre qu'un phospholipide peut interagir avec l'annexine. La signalisation calcique dans la cellule végétale est avant tout un problème de compartimentation, et l'émergence du chloroplaste dans ce schéma ouvre des perspectives originales quant aux fonctions de l'enveloppe au sein de la cellule. En particulier la face externe de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste est en contact permanent avec le cytosol et doit être impliquée dans tout dialogue entre le plaste et le reste de la cellule.

En outre, notre travail ouvre de nombreuses autres perspectives. Tout d'abord, nous maîtrisons un certain nombre de techniques (analyse des protéines hydrophobes, préparation de mutants de cyanobactéries, criblage de mutants d'insertion chez *Arabidopsis*, surexpression des protéines dans des systèmes hétérologues) qui sont applicables de manière systématique à l'étude de toute nouvelle protéine de l'enveloppe des chloroplastes.

D'autre part, parmi les diverses protéines extraites dans les mélanges chloroforme/méthanol nous n'avons encore identifié qu'un nombre limité d'entre elles. Il reste encore de nombreuses



**Figure 57. Profils d'hydrophobicité de quelques protéines membranaires de l'enveloppe extraites dans des mélanges chloroforme/méthanol.** Les protéines insolubles (I2) et les protéines solubles (S20) dans la phase organique sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les profils d'hydrophobicité des protéines identifiées dans la phase organique sont présentés. Les prédictions d'hydrophobicité ont été effectuées en combinant plusieurs "matrices de poids" (Hofmann & Stoffel, 1993). Les profils des protéines p25, p30 et p45Cter correspondent aux dernières protéines identifiées dans cette étude. Seule la partie C terminale de la protéine p45 a été obtenue pour l'instant.



protéines à étudier dans nos extraits, d'autant plus qu'une bande colorée au bleu de Coomassie contient en général plusieurs protéines. Récemment, nous avons obtenu de nouvelles séquences pour les polypeptides présents dans les bandes situées autour de 25, 30 et 45 kDa. L'analyse de ces séquences a permis d'obtenir les séquences nucléotidiques partielles (pour la protéine p45) et complètes (dans le cas des protéines p25 et p30). Ces trois nouvelles protéines sont toutes hydrophobes (figure 57) et présentent des homologies significatives avec des protéines impliquées dans des transports de type procaryote. La caractérisation fonctionnelle de ces protéines rend possible l'identification de nouvelles activités dans l'enveloppe et donc la mise en évidence de nouvelles propriétés de l'enveloppe des chloroplastes.

D'autre part, l'analyse du protéome hydrophobe après extraction des protéines par des solvants organiques ne se limite pas au seul cas de l'enveloppe. Cette approche peut très aisément être étendue à l'étude d'autres systèmes membranaires. Au cours d'expériences préliminaires, nous avons en effet montré qu'il était possible d'extraire des protéines hydrophobes à partir de membranes aussi variées que la membrane plasmique, le tonoplaste, ou les membranes de mitochondries végétales. Cependant cette technique doit être optimisée pour chaque type de système membranaire.

Enfin, la caractérisation complète des protéines les plus hydrophobes d'un système membranaire rend possible l'analyse ultérieure de fractions membranaires de plus en plus complexes, comme des membranes traitées par des solutions alcalines ou salines. En effet, les protéines extraites par le chloroforme/méthanol représentent entre le tiers et le quart des protéines intrinsèques qui ne sont pas extraites de l'enveloppe par des traitements à la soude 0,1 N (Joyard *et al.*, 1982). Aussi, l'identification des protéines hydrophobes dans des préparations d'enveloppe traitées à la soude devrait faciliter l'identification des autres protéines intrinsèques, puis périphériques. Bien sûr, ceci n'est possible que parce que le séquençage massif donne la possibilité d'analyser des mélanges de protéines plus ou moins complexes au sein d'une même bande séparée par électrophorèse. Ainsi, par fractionnements successifs, il sera possible d'avoir une vision plus complète des protéines associées à un système membranaire, qu'elles soient intrinsèques ou périphériques. Une telle approche doit donc être conçue comme étant complémentaire des approches protéomiques après séparation bidimensionnelle. En effet, cette technique donne accès aux protéines les plus solubles de la membrane analysée. Ainsi, à terme, on peut espérer qu'une vision plus globale de l'équipement protéique d'un système membranaire pourra émerger.



- Adessi C., Miège C., Albrieux C. & Rabilloud T.** (1997) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins : a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 127-135.
- Adessi C., Chapel A., Vincon M., Rabilloud T., Klein G., Satre M. & Garin J.** (1995) Identification of major proteins associated with *Dictyostelium discoideum* endocytic vesicles. *J. Cell Sci.*, **108**, 3331-3337.
- Anderson J.A., Huprikar S.S., Kochian L.V., Lucas W.J. & Gaber R.F.** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3736-3740.
- Anderson J.W.** (1990) Sulfur metabolism in plants. *In The Biochemistry of plants, a comprehensive treatise. Intermediary nitrogen metabolism*, Miflin BJ & Lea P.J. eds., Academic press, San Diego, **16**, 327-381.
- Andrawis A., Solomon M. & Delmer D.P.** (1993) Cotton fiber annexins : a potential role in the regulation of callose synthase. *Plant J.*, **3**, 763-772.
- Arnon D.I.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-45.
- Azpiroz-Leehan R. & Feldmann K.A.** (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet.*, **13**, 152-156.
- Ballinger D.G. & Benzer S.** (1989) Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 9402-9406.
- Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G., Klämbt D., Maurel C., Palme K., Schnell J. & Guern J.** (1991) Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant J.*, **1**, 83-93.
- Barbier-Brygoo H., Joyard J., Pugin A. & Ranjeva R.** (1997) Intracellular compartmentation and intracellular signalling. *Trends Plant Sci.*, **2**, 214-222.
- Bathey N.H., James N.C. & Greenland A.J.** (1996) cDNA isolation and gene expression of the maize annexins p33 and p35. *Plant Physiol.*, **112**, 1391-1396.
- Bechtold N., Ellis J. & Pelletier G.** (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **316**, 1194-1199.
- Benz R.** (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes : review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**, 167-196.
- Berkowitz G.A. & Wu W.** (1993) Magnesium, potassium flux and photosynthesis. *Magnes. Res.*, **6**, 257-265.
- Besson V., Neuburger M., Rébeillé F. & Douce R.** (1995) Evidence for three serine hydroxymethyltransferases in green leaf cells. Purification and characterization of the mitochondrial and chloroplastic isoforms. *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, 665-673.
- Bethke P.C., Gilroy S. & Jones R.L.** (1995) Calcium and plant hormone action. *In Plant hormones*, 298-317, PJ Davies, eds., Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Billecocq A.** (1974) Structure des membranes biologiques : localisation des galactosyldiglycérides dans les diverses membranes du chloroplaste au moyen des anticorps spécifiques. II Etudes en microscopie électronique à l'aide d'un marquage à la peroxydase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **352**, 245-251.

- Billecocq A.** (1975) Structure des membranes biologiques : localisation du sulfoquinovosyldiglycéride dans les diverses membranes du chloroplaste. *Ann. Immunol.* (Paris), **126C**, 337-352.
- Billecocq A., Douce R. & Faure M** (1972) Structure des membranes biologiques : localisation des galactosyldiglycérides au moyen des anticorps spécifiques. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, **275**, 1135-1137.
- Bjellqvist B., Hughes G.J., Pasquali Ch., Paquet N., Ravier F., Sanchez J.-Ch., Frutiger S. & Hochstrasser D.F.** (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, **14**, 1023-1031.
- Bjellqvist B., Basse B., Olsen E. & Celis J.E.** (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, **15**, 529-539.
- Blackbourn H.D., Walker J.H. & Battey N.H.** (1991) Calcium-dependent phospholipid-binding proteins in plants. Their characterization and potential for regulating cell growth. *Planta*, **184**, 67-73.
- Blackbourn H.D., Barker P.J., Huskisson N.S. & Battey N.H.** (1992) Properties and partial sequence of plant annexins. *Plant Physiol.*, **99**, 864-871.
- Blackbourn H.D. & Battey P.J.** (1993) Annexin-mediated secretory vesicle aggregation in plants. *Physiol. Plant.*, **89**, 27-32.
- Bligh E.G. & Dyer W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. & Douce R.** (1983a) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I. Electrophoresis and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13273-13280.
- Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. & Douce R.** (1983b) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II-Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13281-13286.
- Bölter B., Soll J., Schulz A., Hinnah S. & Wagner R.** (1998) Origin of a chloroplast protein importer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15831-15836.
- Bouchez D. & Höfte H.** (1998) Functional genomics in plants. *Plant Physiol.*, **118**, 725-732.
- Boustead C.M., Smallwood M., Small H., Bowles D.J. & Walker J.H.** (1989) Identification of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid-binding proteins in higher plant cells. *FEBS Lett.*, **244**, 456-460.
- Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bruce B.D.** (1998) The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 223-246.
- Brunswick P. & Cresswell C.F.** (1988a) Nitrite uptake into intact pea chloroplasts. I. Kinetics and relationship with nitrite assimilation. *Plant Physiol.*, **86**, 378-383.

- Brunswick P. & Cresswell C.F.** (1988b) Nitrite uptake into intact pea chloroplasts. I. Influence of electron transport regulators, uncouplers, ATPase and anion uptake inhibitors and protein binding reagents. *Plant Physiol.*, **86**, 384-389.
- Bryan J.K.** (1990) Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. In *The Biochemistry of plants.*, B.J. Mifflin eds., Academic press, New York, **5**, 403-452.
- Burger A., Voges D., Demange P., Perez C.R., Huber R. & Berendes R.** (1994) Structural and electrophysiological analysis of annexin V mutants. *J. Mol. Biol.*, **237**, 479-499.
- Caliebe A., Grimm R., Kaiser G., Lübeck J., Soll J. & Heins L.** (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.*, **16**, 7342-7350.
- Calvert C.M., Gant S.J. & Bowles D.J.** (1996) Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding. *Plant Cell*, **8**, 333-342.
- Carde J.P., Joyard J. & Douce R.** (1982) Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastids. *Biol. Cell.*, **44**, 315-324.
- Catterall W.A.** (1994) Molecular properties of a superfamily of plasma-membrane cation channels. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 607-615.
- Chang A.C. & Cohen S.N.** (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**, 1141-56.
- Chua N.H.** (1980) Electrophoresis analysis of chloroplast proteins. *Methods Enzymol.*, **69**, 434-436.
- Clark G.B., Dauwalder M. & Roux S.J.** (1992) Purification and immunolocalization of an annexin-like protein in pea seedlings. *Planta*, **187**, 1-9.
- Clark G.B., Turnwald S., Tirlapur U.K., von der Mark K., Roux S.J. & Scheuerlein R.** (1995) Induction and polar distribution of annexin-like proteins during phytochrome-mediated rhizoid initiation and growth in spores of the ferns *Dryopteris* and *anemia*. *Planta*, **197**, 376-384.
- Clark G.B. & Roux S.J.** (1995) Annexins of plant cells. *Plant Physiol.*, **109**, 1133-1139.
- Clark G.B. & Roux S.J.** (1999) Isolation and characterization of two different *Arabidopsis* annexin cDNA. *Plant Physiol.*, **120**, 340-340.
- Cline K., Andrews J., Mersey B., Newcomb E.H. & Keegstra K.** (1981) Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3595-3699.
- Cowan S.W., Schirmer T., Rummel G., Steinert M., Ghosh R., Paupit R.A., Jansonius J.N. & Rosenbusch J.P.** (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*, **358**, 727-733.
- Crawford N.M.** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, **7**, 859-868.
- Creutz C.E.** (1992) The Annexins and exocytosis. *Science*, **258**, 924-931.
- Crompton M.R., Moss S.E & Crompton M.J.** (1988) Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell*, **55**, 1-3.

- Curien G., Job D., Douce R. & Dumas R.** (1998) Allosteric activation of *Arabidopsis* threonine synthase by *S*-adenosylmethionine. *Biochemistry*, **37**, 13212-13221.
- Day D.A., Neuburger M. & Douce R.** (1985) Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, **12**, 219-228.
- De Carvalho-Niebel F., Lescure N., Cullimore J.V. & Gamas P.** (1998) The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **11**, 504-513.
- Delmer D.P. & Potikha T.S.** (1997) Structures and functions of annexins in plants. *Cell. Mol. life Sci.*, **53**, 546-553.
- Demmig B. & Gimmler H.** (1983) Properties of the isolates intact chloroplast at cytoplasmic K<sup>+</sup> concentrations. *Plant Physiol.*, **73**, 169-174.
- De Pinto V., Prezioso G., Thinnes F.P., Link T.A. & Palmieri F.** (1991) Peptide-specific antibodies and proteases as probes of the transmembrane topology of the heart mitochondrial porin. *Biochemistry*, **30**, 10191-10206.
- Dorne A.J., Joyard J., Block M.A. & Douce R.** (1985) Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J. Cell Biol.*, **100**, 1690-1697.
- Dorne A.J., Joyard J. & Douce R.** (1987) Lipid metabolism of a tertiary relic species, Kerguelen cabbage (*Pringlea antiscorbutica*). *Can. J. Bot.*, **65**, 2368-2372.
- Douce R., Holtz R.B. & Benson A.A.** (1973) Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **248**, 7215-7222.
- Douce R. & Joyard J.** (1980) Plant galactolipids. **In** *The biochemistry of plants*, **4**, *Lipids : structure and function*, 321-362, Stumpf P.K. eds., Academic press, Inc., New-York.
- Douce R. & Joyard J.** (1982) Purification of the chloroplast. **In** *Methods in chloroplast Molecular Biology*, 239-256, Edelman, M., Hallick, R. and Chua, N.-H. eds., Amsterdam Elsevier Science Publishers BV.
- Douce R. & Joyard J.** (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **6**, 173-216.
- Douce R. & Joyard J.** (1996) Biosynthesis of thylakoid membrane lipids. **In** *Advances in photosynthesis. Oxygenic photosynthesis : the light reactions*, Vol. 4, 69-101, Ort, D.R. & Yocum, C.F. eds., Kluwer Academic Publishers.
- Dreses-Werringloer U., Fischer K., Wachter E., Link T.A. & Flügge U.I.** (1991) cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the precursor of the 37-kDa inner envelope membrane polypeptide from spinach chloroplasts. Its transit peptide contains an amphiphilic alpha-helix as the only detectable structural element. *Eur. J. Biochem.*, **195**, 361-368.
- Dumas R., Curien G., DeRose R.T. & Douce R.** (1993) Branched-chain-amino-acid biosynthesis in plants: molecular cloning and characterization of the gene encoding acetohydroxy acid isomeroreductase (ketol-acid reductoisomerase) from *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J.*, **294**, 821-828.
- Durrant I.** (1990) Light-based detection of biomolecules. *Nature*, **346**, 297-298.
- Evans D.E., Briars S.A. & Williams L.E.** (1991) Active Ca<sup>2+</sup> transport by plant cell membranes. *J. Exp. Bot.*, **42**, 285-303.

- Feinberg A.P. & Vogelstein B.** (1983) A technique for radio-labeling DNA to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 36-38.
- Feldmann K.A.** (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* : mutational spectrum. *Plant J.*, **1**, 71-82.
- Feldmann K.A. & Marks M.D.** (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* : a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.*, **208**, 1-9.
- Fischer K., Arbinger B., Kammerer B., Busch C., Brink S., Walmeier H., Sauer N., Eckerskorn C. & Flüge U.I.** (1994) Cloning and *in vivo* expression of functional triose phosphate/phosphate translocators from C3- and C4-plants: evidence for the putative participation of specific amino acid residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. *Plant J.*, **5**, 215-226.
- Fischer K., Kammerer B., Gutensohn M., Arbinger B.; Weber A., Häusler R.E. & Flüge U.I.** (1997) A new class of plastid phosphate translocators : a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell*, **9**, 453-462.
- Folch J. & Lees M.** (1951) Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. Their isolation from brain. *J. Biol. Chem.* **191**, 807-817.
- Flüge U.I.** (1985) Hydrodynamic properties of the Triton X-100 solubilized chloroplast phosphate translocator. *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 299-305.
- Flüge U.I.** (1998) Metabolite transporters in plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 201-206.
- Flüge U.I.** (1999) Phosphate translocators in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 27-45.
- Flüge U.I. & Heldt** (1981) The phosphate translocator of the chloroplast envelope, isolation of the carrier protein and reconstitution of transport. *Biochem. Biophys. Acta*, **638**, 296-304.
- Flüge U.I., Stitt M. & Heldt H.W.** (1985) Light-driven uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts from maize. *FEBS Lett.*, **183**, 335-339.
- Flüge U.I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F. & Eckerskorn C.** (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts : nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J.*, **8**, 39-46.
- Flüge U.I. & Weber A.** (1994) A rapid method for measuring organelle-specific substrate transport in homogenates from plant tissues. *Planta*, **194**, 181-185.
- Flüge U.I., Weber A., Fischer K., Häusler R. & Kammerer B.** (1996) Molecular characterization of plastid transporters. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **319**, 849-852.
- Fox T.C. & Guerinot M.L.** (1998) Molecular biology of cation transport in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 669-696.
- Fuks B. & Homblé F.** (1995) A voltage-dependent porin-like channel in the inner envelope membrane of plant chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9947-9952.
- Fuks B. & Homblé F.** (1999) Passive anion transport through the chloroplast inner envelope membrane measured by osmotic swelling of intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1416**, 361-369.

- Garrels J.I., McLaughlin C.S., Warner J.R., Futcher B., Latter G.I., Kobayashi R., Schwender B., Volpe T., Anderson D.S., Mesquita-Fuentes R. & Payne W.E.** (1997) Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis*, **18**, 1347-1360.
- Gerbeau P., Gu L.J., Ripoche P. & Maurel C.** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.*, **18**, 577-587.
- Gerke V. & Moss S.E.** (1997) Annexins and membrane dynamic. *Biochim. Biophys. Acta*, **1357**, 129-154.
- Gidrol X., Sabelli P.A., Fern Y.S. & Kush A.K.** (1996) Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues  $\Delta oxyR$  mutant of *Escherichia coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11268-11273.
- Görg A., Boguth G., Obermaier C. & Weiss W.** (1998) Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis*, **19**, 1516-1519.
- Gray J.C. & Row P.E.** (1995) Protein translocation across chloroplast envelope membranes. *Trends Cell Biol.*, **5**, 243-247.
- Gruenberg J. & Emans N.** (1993) Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol.*, **3**, 224-227.
- Hatch M.D., Dröscher L., Flügge U.I. & Heldt H.W.** (1984) A specific translocator for oxaloacetate transport in chloroplasts. *FEBS Lett.*, **178**, 15-19.
- Heber U. & Purzeld P.** (1978) Substrate and product fluxes across the chloroplast envelope during bicarbonate and nitrite reduction. **In** *Proceeding of the fourth international congress on photosynthesis*, 107-118, Hall D.O., Coombs J. & Goodwin T.W. eds., The biochemical Society, London.
- Heber U. & Heldt H.W.** (1981) The chloroplast envelope: structure, function, and rôle in chloroplast metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 139-168.
- Heiber T., Steinkamp T., Hinnah S., Schwarz M., Flügge U.I., Weber A. & Wagner R.** (1995) Ion channels in the chloroplast envelope membrane. *Biochem.*, **34**, 15906-15917.
- Heins L., Collinson I. & Soll J.** (1998) The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes. *Trends Plant Sci.*, **3**, 56-61.
- Heldt H.W.** (1969) Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts. *FEBS Lett.*, **178**, 15-19.
- Heldt H.W.** (1976) Metabolite transport in intact spinach chloroplasts. **In** *The intact chloroplast*, 171-214, Barber J. eds., Elsevier/North-Holland biochemical press, Netherlands.
- Heldt H.W.** (1980) Measurement of metabolite movement across the envelope and of the pH in the stroma and the thylakoid space in intact chloroplasts. *Meth. Enzymol.*, **69C**, 604-613.
- Heldt H.W. & Rapley L.** (1970) Unspecific permeation and specific uptake of substances in spinach chloroplasts. *FEBS Lett.*, **7**, 139-142.
- Heldt H.W. & Flügge U.I.** (1987) Subcellular transport of metabolites in a plant cell. **In** *The biochemistry of plants*, Academic Press, New York, **12**, 49-85.



- Heldt H.W., Flügge U.I. & Borchert S.** (1991) Diversity of specificity and function of phosphate translocators in various plastids. *Plant Physiol.*, **95**, 341-343.
- Hofmann K. & Stoffel W.** (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **347**, 166.
- Hoshino T., Mizutani A., Chida M., Hidaka H. & Mizutani J.** (1995) Plant annexin form homodimer during  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent liposome aggregation. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35**, 749-755.
- Howitz K.T. & Mc Carty R.E.** (1985) Kinetic characteristics of the chloroplast envelope glycolate transporter. *Biochemistry*, **24**, 2645-2652.
- Howitz K.T. & Mc Carty R.E.** (1991) Solubilization, partial purification, and reconstitution of the glycolate/glycerate transporter from chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiol.*, **96**, 1060-1069.
- Huang L., Berkelman T., Franklin A.E. & Hoffman N.E.** (1993) Characterization of a gene encoding a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10066-10070.
- Huber S.C. & Maury W.** (1980) Effects of magnesium on intact chloroplasts. *Plant Physiol.*, **65**, 350-354.
- Johnson C.H., Knight M.R., Kondo T., Masson P., Sedbrook J., Haley A. & Trewavas A.** (1995) Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, **269**, 1863-1865.
- Journet E.P. & Douce R.** (1985) Enzymatic capacities of purified cauliflower bud plastids for the lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.*, **79**, 458-467.
- Joyard J.** (1979) L'enveloppe des chloroplastes. Thèse de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France.
- Joyard J. & Douce R.** (1975)  $\text{Mn}^{2+}$ -dependent ATPase of the envelope of spinach chloroplasts. *FEBS Lett.*, **51**, 335-340.
- Joyard J. & Douce R.** (1976) Préparation et activités enzymatiques de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard. *Physiol. Vég.*, **14**, 31-48.
- Joyard J. & Douce R.** (1977) Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 273-285.
- Joyard J., Grossman A., Bartlett S.G., Douce R. & Chua N.H.** (1982) Characterization of envelope membrane polypeptides from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1095-1101.
- Joyard J., Billecocq A., Bartlett S.G., Block M.A., Chua N.H. & Douce R.** (1983) Localization of polypeptides to the cytosolic side of the outer envelope membrane of spinach chloroplast. *J. Biol. Chem.*, **258**, 10000-10006.
- Joyard J., Block M.A., Dorne A.J. & Douce R.** (1987) Comparison of envelope membranes from higher plants and algae plastids and of outer membranes from cyanobacteria (Blue-green algae). In *Molecular and cellular aspects of the algal development*, 123-133, Wiessner W., Robinson D.G., Starr R.C. eds., Springer-Verlag, Berlin.
- Joyard J., Teyssier E., Miège C., Berny-Seigneurin D., Maréchal E., Block M.A., Dorne A.J., Rolland N., Ajlani G. & Douce R.** (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.*, **118**, 715-723.

- Kaiser K. & Goodwin S.F.** (1990) "Site-selected" transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1686-1690.
- Kaiser G. & Heber U.** (1983) Photosynthesis of leaf cell protoplasts and permeability of the plasmalemma to some solutes. *Planta*, **157**, 462-470.
- Kampfenkel K., Möhlmann T., Batz O., van Montagu M., Inzé D. & Neuhaus H.E.** (1995) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Lett.*, **374**, 351-355.
- Kaneko T. & Tabata S.** (1997) Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell. Physiol.*, **38**, 1171-1176.
- Kates M.** (1986) Separation of lipid mixtures. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Techniques of lipidology*, 186-278, Burdon RH, van Knippenberg PH eds., Elsevier, Amsterdam.
- Kessler F., Blobel G., Patel H.A. & Schnell D.J.** (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*, **266**, 1035-1039.
- Ko K., Bornemisza O., Kourtz L., Ko Z.W., Plaxton W.C. & Cashmore A.R.** (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a cognate 70-kDa heat shock protein of the chloroplast envelope. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2986-2993.
- Ko K., Budd D., Wu C., Seibert F., Kourtz L. & Ko Z.W.** (1995) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a member of the Com44/Cim44 envelope components of the chloroplast protein import apparatus. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28601-28608.
- Kouranov A. & Schnell D.J.** (1997) Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.*, **139**, 1677-1685.
- Kouranov A., Chen X., Fuks B. & Schnell D.J.** (1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol.*, **143**, 991-1002.
- Korshunova Y.O., Eide D., Clark W. G., Guerinot M.L. & Himadri B.** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 37-44.
- Kovacs I., Ayaydin F., Oberschall A., Ipacs I., Bottka S., Pongor S., Dudits D. & Toth E.C.** (1998) Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. *Plant J.*, **15**, 185-197.
- Krause G.H. & Heber U.** (1976) Energetics of intact chloroplasts. In *The intact chloroplast*, 171-214, Barber J. eds., Elsevier/North-Holland biochemical press, Netherlands.
- Kreimer G., Melkonian M., Holtum J.A. & Latzko E.** (1985) Characterization of calcium fluxes across the envelope of intact spinach chloroplasts. *Planta*, **166**, 515-523.
- Kreimer G., Melkonian M. & Latzko E.** (1985b) An electrogenic uniport mediates light-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx into intact spinach chloroplasts. *FEBS Lett.*, **180**, 253-258.
- Kreimer G., Melkonian M., Holtum J.A. & Latzko E.** (1988) Stromal free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.*, **86**, 423-428.

- Kroll R.G. & Booth I.R.** (1983) The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **216**, 709-716.
- Laursen R.A.** (1971) Solid-phase Edman degradation. An automatic peptide sequencer. *Eur. J. Biochem.*, **20**, 89-102.
- Lim E.K., Roberts M.R. & Bowles D.J.** (1998) Biochemical characterization of tomato annexin p35 : independence of calcium binding and phosphatase activities. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34920-34925.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lübeck J., Soll J., Akita M., Nielsen E. & Keegstra K.** (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.*, **15**, 4230-4238.
- Lunn J.E. & Douce R.** (1993) Transport of inorganic pyrophosphate across the spinach chloroplast envelope. *Biochem. J.*, **290**, 375-379.
- Lurin C., Geelen D., Barbier-Brygoo H., Guern J. & Maurel C.** (1996) Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell*, **8**, 701-711.
- Ma Y., Kouranov A., Lasala S. & Schnell D.J.** (1996) Two components of the chloroplast import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and the translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J. Cell Biol.*, **134**, 315-327.
- Maloney P.C.** (1994) Bacterial transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 571-582.
- Maniatis T., Fritsh E.F. & Sambrook J.** (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Maury W.J., Huber S.C. & Moreland D.E.** (1981) Effects of magnesium on intact chloroplasts. II Cation specificity and involvement of the envelope ATPase in (sodium) potassium/proton exchange across the envelope. *Plant Physiol.*, **76**, 584-588.
- Mc Carty D.R., Keegstra K. & Selman B.R.** (1984) Characterization and localization of the ATPase associated with pea chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol.*, **76**, 584-588.
- Mc Clung A.D., Carroll A.D. & Battey N.H.** (1994) Identification and characterization of ATPase activity associated with maize (*Zea mays*) annexins. *Biochem. J.*, **303**, 709-712.
- Menzlaff E. & Flügge U.I.** (1993) Purification and functional reconstitution of the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *Biochim. biophys. acta*, **1147**, 13-18.
- Merril C.R., Goldman D., Sedman S.A. & Ebert M.H.** (1981) Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, **211**, 1437-1438.
- Mi F., Peters J.S. & Berkowitz G.A.** (1994) Characterization of a chloroplast inner envelope K<sup>+</sup> channel. *Plant Physiol.*, **105**, 955-964.
- Mi F. & Berkowitz G.A.** (1995) Development of a K<sup>+</sup>-channel probe and its use for identification of an intracellular plant membrane K<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 3386-3390.

- Miège C.** (1998) Caractérisation moléculaire et biochimique de la monogalactosyl diacylglycérol synthase (MGDG synthase) de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard. Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Mizutani A., Usuda N., Tokumitsu H., Minami K., Yasui K., Kobayashi R. & Hidaka H.** (1992) CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13498-13504.
- Molloy M.P., Herbert B.R., Williams K.L. & Gooley A.A.** (1999) Extraction of *Escherichia coli* proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **20**, 701-704.
- Morris H.R., Paxton T., Dell A., Langhorne J., Berg M., Bordoli R.S., Hoyes J. & Bateman R.H.** (1996). High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 889-896.
- Mourioux G.** (1981) Quelques observations sur le passage du phosphate, du sulfate, et du pyrophosphate à travers l'enveloppe des chloroplastes. Thèse de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France.
- Mourioux G. & Douce R.** (1978) Transport spécifique du sulfate à travers l'enveloppe des chloroplastes d'epinard. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **286**, 277-280.
- Muto S., Izawa S. & Miyachi S.** (1982) Light-induced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by intact chloroplasts. *FEBS Lett.*, **139**, 250-254.
- Nakayama M., Masuda T., Bando T., Yamagata H., Ohta H. & Takamiya K.** (1998) Cloning and expression of the soybean chlH gene encoding a subunit of Mg-chelatase and localization of the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration-dependent ChlH protein within the chloroplast. *Plant Cell Physiol.*, **39**, 275-284.
- Neuburger M., Rebeille F., Jourdain A., Nakamura S. & Douce R.** (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9466-9472.
- Neuhaus H.E., Thom E., Möhlmann T., Steup M. & Kampfenkel K.** (1997) Characterization of a novel ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant J.*, **11**, 73-82.
- Ohlrogge J.B., Kuhn D.N. & Stumpf P.K.** (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1194-1198.
- Padan E., Zilberstein D. & Schuldiner S.** (1981) pH homeostasis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 151-166.
- Padan E., Maisler N., Taglicht D., Karpel R. & Schuldiner S.** (1989) Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter system(s). *J. Biol. Chem.*, **264**, 20297-20302.
- Peters J.S. & Berkowitz G.A.** (1991) Studies on the system regulating proton movement across the chloroplast envelope. *Plant Physiol.*, **95**, 1229-1236.
- Pineau B., Ledoigt G., Maillefer C. & Lefort-Tran M.** (1979) Présence des sous-unités de la RuBPCase dans les enveloppes des chloroplastes d'épinard. *Plant Sci. Lett.*, **15**, 331-343.
- Pirck M., Hirt H. & Heberle-Bors E.** (1994) The cDNA sequence encoding an annexin from *Medicago sativa*. *Plant Physiol.*, **104**, 1463-1464.

- Plack R.H. & Rosen B.P.** (1980) Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3824-3825.
- Pohlmeier K., Soll J., Steinkamp T., Hinnah S. & Wagner R.** (1997) Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 9504-9509.
- Pohlmeier K., Soll J., Grimm R., Hill K. & Wagner R.** (1998) A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Plant Cell*, **10**, 1207-1216.
- Pollard H.B. & Rojas E.** (1988) Ca<sup>2+</sup>-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 2974-2978.
- Pollard H.B., Guy R.H. & Arispe N.** (1992) Ca<sup>2+</sup> channel and membrane fusion activity of synexin and other members of the annexin gene family. *Biophys. J.*, **62**, 15/29.
- Portis A. & Heldt H.W.** (1976) Light dependant changes of the Mg<sup>2+</sup> concentration in the stroma in relation to the Mg<sup>2+</sup> dependency of CO<sub>2</sub> fixation in intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 434-446.
- Potikha T.S. & Delmer D.P.** (1997) cDNA clones for annexin AnnGh1 and annexin AnnGh2 from *Gossypium hirsutum* (cotton) *Plant Physiol.*, **113**: 305.
- Pottosin I.I.** (1992) Single channel recording in the chloroplast envelope. *FEBS Lett.*, **308**, 87-90.
- Pottosin I.I.** (1993) One of the chloroplast envelope ion channels is probably related to the mitochondrial VDAC. *FEBS Lett.*, **330**, 211-214.
- Prentki P. & Krisch H.M.** (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, **29**, 303-313.
- Proust J., Houlne G., Schantz M.L. & Schantz R.** (1996) Characterization and gene expression of an annexin during fruit development in *Capsicum annum*. *FEBS Lett.*, **383**, 208-212.
- Proust J., Houlne G., Schantz M.L., Shen W.H. & Schantz R.** (1999) Regulation of biosynthesis and cellular localization of Sp32 annexins in tobacco BY2 cells. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 361-372.
- Rabilloud T., Vincon M. & Garin J.** (1995) Micropreparative one- and two-dimensional electrophoresis : improvement with new photopolymerization systems. *Electrophoresis*, **16**, 1414-1422.
- Rabilloud T., Kieffer S., Procaccio V., Louwagie M., Courchesne P.L., Patterson S.D., Martinez P., Garin J. & Lunardi J.** (1998) Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry : toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis*, **19**, 1006-1014.
- Rainteau D., Mansuelle P., Rochat H. & Weinman S.** (1995) Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria. *FEBS Lett.*, **360**, 80-84.
- Randall P.J. & Bouma D.** (1973) Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol.*, **52**, 229-232.
- Ranjeva R., Thuleau P., Thion L., Graziana A., Mazars C. & Rossignol M.** (1996) Calcium entry into higher plant cells : voltage-operated plasma membrane-bound Ca<sup>2+</sup> channels. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **319**, 1063-1070.

- Ravanel S., Gakière B., Job D. & Douce R.** (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7805-7812.
- Raynal P. & Pollard H.B.** (1994) Annexins : the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional Ca<sup>2+</sup> and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**, 63/93.
- Robinson S.P.** (1982) Transport of glycerate across the envelope membrane of isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **70**, 1032-1038.
- Roh M.H., Shingles R., Cleveland M.J. & McCarty R.E.** (1998) Direct measurement of calcium transport across chloroplast inner-envelope vesicles. *Plant Physiol.*, **118**, 1447-1454.
- Rolland N., Droux M., Lebrun M. & Douce R.** (1993) O-acetylserine(thiol)lyase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf : cDNA cloning, characterization and overexpression in *Escherichia coli* of the chloroplast isoform. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 213-222.
- Rolland N., Dorne A.-J., Amoroso G., Sültemeyer D.F., Joyard J. & Rochaix J.-D.** (1997) Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.*, **16**, 6713-6726.
- Rose R.E.** (1988) The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 355.
- Saint-Blancard J., Foucard J., Limmone F., Girot P. & Boschetti E.** (1981) Nouveaux échangeurs d'ions Trisacryl : intérêt et application du fractionnement des protéines du plasma humain. *Ann. Pharm. Fr.*, **39**, 403-409.
- Salomon M., Fischer K., Flüge U.I. & Soll J.** (1990) Sequence analysis and protein import studies of an outer chloroplast envelope polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5778-5782.
- Sanchez J.C., Hochstrasser D. & Rabilloud T.** (1999) In-gel sample rehydration of immobilized pH gradient. *Methods Mol. Biol.*, **112**, 221-225.
- Santoni V., Rouquié D., Dumas P., Mansion M., Boutry M., Degand H., Duprée P., Packman L., Sherrier J., Prime T., Bauw G., Posada E., Rouzé P., Dehais P., Sahnoun I., Barlier I. & Rossignol M.** (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J.*, **16**, 633-641.
- Sasaki Y., Sekiguchi K., Nagano Y & Matsumo R.** (1993) Chloroplast envelope protein encoded by the chloroplast genome. *FEBS Lett.*, **316**, 93-98.
- Sato N., Rolland N., Block M.A. & Joyard J.** (1999) Do plastid envelope membranes play a role in the expression of the plastid genome ? *Biochimie*, **81**, 619-629.
- Schäfer G., Heber U. & Heldt H.W.** (1977) Glucose transport into Spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **60**, 286-289.
- Schnell D.J.** (1995) Shedding light on the chloroplast protein import machinery. *Cell*, **83**, 521-524.
- Schnell D.J., Kessler F. & Blobel G.** (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, **266**, 1007-1012.
- Schwarz M., Gross A., Steinkamp T., Flüge U.I. & Wagner R.** (1994) Ion channel properties of the reconstituted chloroplast triose phosphate/phosphate translocator. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29481-29489.

- Seals D.F., Parrish M.L. & Randall S.K.** (1994) A 42-kilodalton annexin-like protein is associated with plant vacuoles. *Plant Physiol.*, **106**, 1403-1412.
- Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J.M., Gaymard F. & Grignon C.** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, **256**, 663-665.
- Shingles R. & Mc Carty R.E.** (1994) Direct measurement of the ATP-dependent proton concentration changes and characterization of a K<sup>+</sup>-stimulated ATPase in pea chloroplast inner envelope vesicles. *Plant Physiol.*, **106**, 731-737.
- Shingles R., Roh M.H. & McCarty R.E.** (1996) Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles. *Plant Physiol.*, **112**, 1375-1381.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H. & Sugiura M.** (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.*, **5**, 2043-2049.
- Smallwood M., Keen J.N. & Bowles D.J.** (1990) Purification and partial sequence analysis of plant annexins. *Biochem. J.*, **270**, 157-161.
- Smallwood M.F., Gurr S.J., McPherson M.J., Roberts K. & Bowles D.J.** (1992) The pattern of plant annexin gene expression. *Biochem. J.*, **281**, 501-505.
- Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J. & Dubendorff J.W.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Sun J., Bird C.H., Salem H.H. & Bird P.** (1993) Association of annexin V with mitochondria. *FEBS Lett.*, **329**, 79-83.
- Sussman D.J.** (1995) 24-hours assay for estimating the titer of β-galactosidase-expressing baculovirus. *Biotechniques*, **18**, 50-51.
- Swairjo M.A. & Seaton B.A.** (1994) Annexin structure and membrane interactions : a molecular perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 193-213.
- Teysier E., Block M.A., Douce R. & Joyard J.** (1996) Is E37, a major polypeptide of the inner membrane from plastid envelope, an S-adenosyl methionine-dependent methyltransferase ? *Plant J.*, **10**, 903-912.
- Thaler M., Simonis W. & Schönknecht G.** (1992) Light-dependent changes of the cytoplasmic H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> activity in the green alga *Eremosphaera viridis*. *Plant Physiol.*, **99**, 103-110.
- Thiel T.** (1994) Genetic analysis of cyanobacteria. In *The molecular biology of cyanobacteria*, 581-611, D.A. Bryant, eds., Kluwer Academic publisher, Netherlands.
- Vocanson C., Honnorat J., Aguera M., Antoine J.C., Caudie C. & Belin M.F.** (1994) High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using Immobilines. Application to the study of brain proteins. *Cell. Mol. Biol.*, **40**, 9-16.
- Waegemann K. & Soll J.** (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.*, **1**, 149-158.

- Wang X.-C., Berkowitz G.A. & Peters J.S.** (1993). K<sup>+</sup>-conducting ion channel of the chloroplast inner envelope: functional reconstitution into liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 4981-4985.
- Watson J.C. & Thompson W.F.** (1986) Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. *Methods in enzymology.*, **118**, 57-75.
- Weber A., Menzlaff E., Arbinger B., Gutensohn M., Eckerskorn C. & Flüge U.I.** (1995) The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes : molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochemistry*, **34**, 2621-2627.
- Wilkins M.R., Gasteiger E., Sanchez J.C., Bairoch A. & Hochstrasser D.F.** (1998a) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects : the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis*, **19**, 1501-1505.
- Wilkins M.R., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J.-C., Williams K.L., Appel R.D. & Hochstrasser D.F.** (1998b) Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. In: *2-D Proteome Analysis Protocols*. Link A.J., eds. (Totowa, N.J., USA: Humana Press), pp. 531-552.
- Williams J.G.** (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Meth Enzymol.*, **167**, 766-778.
- Wilm M., Shevchenko. A, Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T. & Mann M.** (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, **379**, 466-469
- Woo K.C., Flüge U.I. & Heldt H.W.** (1987) A two-translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in the light. *Plant Physiol.*, **84**, 624-632.
- Wu C., Seibert F.S. & Ko K.** (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32264-32271.
- Wu W. & Berkowitz G.A.** (1991) Lidocaine and ATPase inhibitor interaction with the chloroplast envelope. *Plant Physiol.*, **97**, 1551-1557.
- Wu W. & Berkowitz G.A.** (1992) K<sup>+</sup> stimulation of ATPase activity associated with the chloroplast inner envelope. *Plant Physiol.*, **99**, 553-560.
- Wu W. & Berkowitz G.A.** (1992b) Stroma pH and photosynthesis are affected by electroneutral K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> exchange through chloroplast envelope ion channels. *Plant Physiol.*, **98**, 666-672.
- Yu J. & Woo K.C.** (1988) Glutamine transport and the rôle of the glutamine translocator in chloroplasts. *Plant Physiol.*, **88**, 1048-1054.

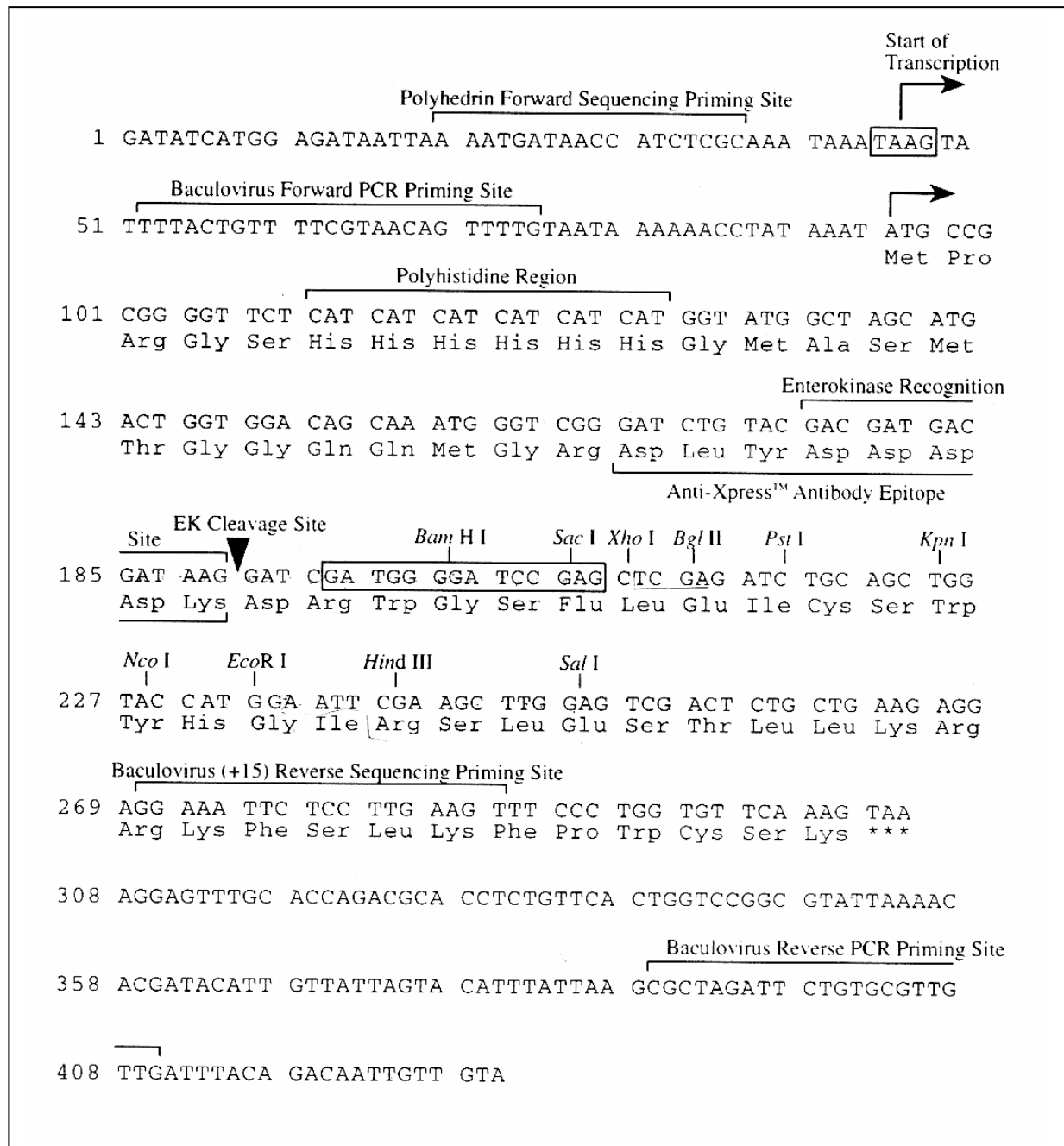


<b>Composition de la solution nutritive utilisée pour arroser les jeunes plants d'épinard (adaptée de Randall &amp; Bouma, 1973)</b>	<b>mg/l</b>
Azote (20 % d'azote ammoniacal, 43 % d'azote uréique et 37 % d'azote nitrique)	150
Phosphore (anhydride phosphorique)	150
Calcium (chlorure de calcium)	160
Potassium (oxyde de potassium)	150
Chlore (chlorure de calcium)	80
Magnésium (61 % d'oxyde de magnésium et 39 % de sulfate de magnésium)	41
Soufre (sulfate de magnésium)	16
Fer (DTPA)	0,75
Manganèse	0,625
Cuivre	0,075
Zinc	0,3
Molybdène	0,025
Bore	0,4

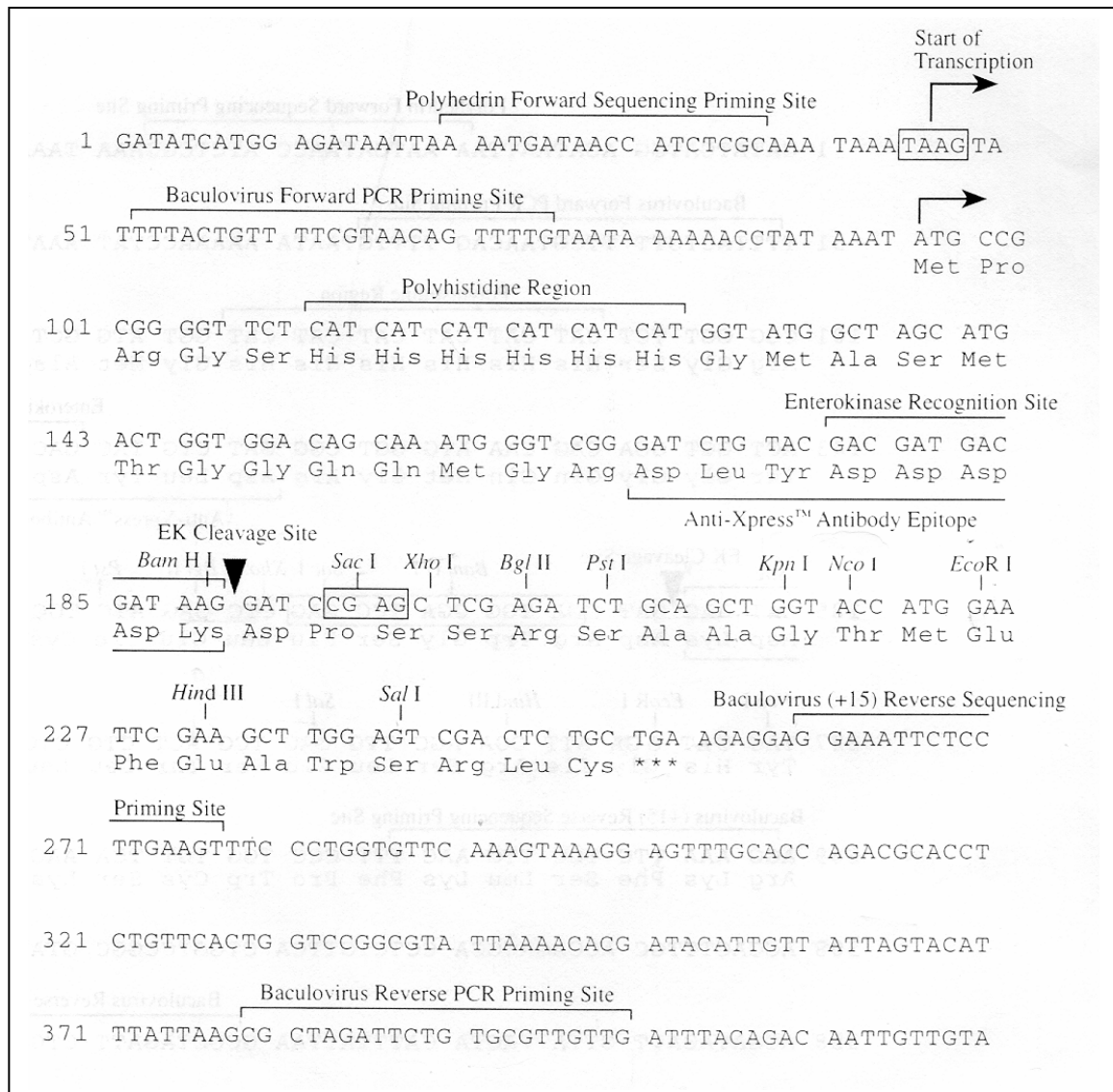
#### Milieu de culture des cyanobactéries :

citrate ferrique	30 $\mu$ M	$K_2HPO_4$	250 $\mu$ M
citrate	30 $\mu$ M	$MgSO_4$	250 $\mu$ M
$Na_2EDTA$	3 $\mu$ M	$CaCl_2$	250 $\mu$ M
$NaNO_3$	30 mM	$Na_2CO_3$	200 $\mu$ M
$NaHCO_3$	5 mM		
1 ml/l d'une solution de microéléments contenant par litre :			
$H_3BO_3$	2,86 g	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,222 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079g	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,0494 g
		$Na_2MoO_4 \cdot 5 H_2O$	0,39 g

*Annexe 1. Composition de la solution nutritive utilisée pour les cultures d'épinard et composition du milieu de culture des cyanobactéries.*



**Annexe 2. Séquence du site de clonage multiple du vecteur pBlueBacHis2 A, utilisé pour l'expression de la protéine p16-2.**



**Annexe 3. Séquence du site de clonage multiple du vecteur pBlueBacHis2B, utilisé pour l'expression des protéines IE18, IE16-1 et ORF229.**

Séquence peptidique I	Asp	Val	leu	Trp	Pro	Ser	Leu	Gly	Ala	Phe
Oligonucléotide 1 (sonde 1)	GA( <b>CT</b> )	GTI	( <b>CT</b> )TI	TGG	CCI	TCI	( <b>CT</b> )TI	GGI	GCI	TT
Oligonucléotide 2 (sonde 2)	GA( <b>CT</b> )	GTI	( <b>CT</b> )TI	TGG	CCI	AG( <b>CT</b> )	( <b>CT</b> )TI	GGI	GCI	TT
Séquence peptidique II	Ala	Ala	ser	Ile	ala	Phe	Glu	Arg		
Oligonucléotide 3 (sonde 3)	GCI	GCI	TCI	AT( <b>ACT</b> )	GCI	TT( <b>CT</b> )	GA( <b>AG</b> )	( <b>AC</b> )G		
Oligonucléotide 4 (sonde 4)	GCI	GCI	AG( <b>CT</b> )	AT( <b>ACT</b> )	GCI	TT( <b>CT</b> )	GA( <b>AG</b> )	( <b>AG</b> )G		

**Annexe 4. Séquences des oligonucléotides utilisés pour détecter le gène codant IE18.** Les oligonucléotides ont été choisis à partir des séquences des deux peptides obtenus par séquençage interne de IE18. Les oligonucléotides 1 et 2 ont été synthétisés à partir de la séquence I, les 3 et 4 à partir de la séquence II. Les différentes combinaisons en acides nucléotidiques sont représentées en caractères gras. I signifie inosine.

**A**

$$AI = A1 + A2 + A3 + A4 + A5$$

$$AII = A6 + A7 + A8 + A9 + A10$$

....

$$AXX = A95 + A96 + A97 + A98 + A99 + A100$$

$$BI = B1 + B2 + B3 + B4 + B5$$

$$BII = B6 + B7 + B8 + B9 + B10$$

....

$$BXX = B95 + B96 + B97 + B98 + B99 + B100$$

Identification des superpools A et B contenant le mutant d'un gène donné. Chaque superpool contient 5 pools de 100 plantes chacun

**B**

	A1	A2			A100		
<b>B1</b>	1	101	201		9701	9801	9901
<b>B2</b>	2	102	202		9702	9802	9902
	3	103	203		9703	9803	9903
	98	198	298		9798	9898	9998
	99	199	299		9799	9899	9999
<b>B100</b>	100	200	300		9800	9900	10000

Identification des pools A et B contenant le mutant du gène recherché. Le croisement entre le pool A et le pool B permet d'obtenir

**Annexe 5. Organisation des superpools et des pools A et B de la banque d'insertion d'*Arabidopsis thaliana*. Stratégie du criblage.** **A.** Organisation des superpools A et B (préparés par Frédéric Gaymard, INRA de Montpellier). Chaque superpool contient 5 pools soit l'ADN génomique correspondant à 500 plantes. La première étape du criblage consiste à analyser par PCR l'ADN génomique contenu dans les superpools et à déterminer celui qui contient un mutant du gène d'intérêt. **B.** Organisation des pools A et B. Chaque pool contient l'ADN de 100 plantes. Les pools A et B sont organisés dans un tableau à deux dimensions. L'identification du pool A et du pool B contenant le même mutant permet par croisement à l'aide du tableau d'obtenir la plante mutée pour le gène recherché.

**Query Sequence: Mutant  $\Delta 18-1$ , AVII. (Length: 326)**

GenBank|AB009053|AB009053 Arabidopsis thaliana genomic DN... 775 7.5e-29 1  
 gb|M61151|ATUAUX Agrobacterium rhizogenes tryptophan oxygena... 353 2e-95

♦ AB009053|AB009053 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5,  
 P1 [GenBank/EMBL]

Score = 775 (116.3 bits), Expect = 7.5e-29, P = 7.5e-29  
 Identities = 189/212 (89%), Positives = 189/212 (89%), Strand = Minus / Plus

Query: 326 CTCTTTTGCTGAGTGACGTCATATGGCCTGCTGCTGGTTAGTCATTTAAAAAGAATTACT 267  
 |||  
 Sbjct: 6870 CTCTTTTGCTGAGTGACGTCATATGGCCTGCTGCTGGTTAGTCATTTAAAAAGAATTACT 6929

Query: 266 ATTTACTAATTACTAATTTAGTGATTTAAGATCACAAATTTAATTAGTATTTTTTTGTCAA 207  
 |||  
 Sbjct: 6930 ATTTACTAATTACTAATTTAGTGATTTAAGATCACAAATTTAATTAGTATTTTTTTGTCAA 6989

Query: 206 ATGCTTTGAGATATATAAATTCCTTTACTGATATATGC-CAA-CGT-AAAAAT-GAGGGC- 152  
 |||  
 Sbjct: 6990 ATGCTTTGAGATATATAAATTCCTTTACTAATGTTTTCTCGATCGTCAAAAATTGATTGCT 7049

Query: 151 -AATC-GATTGTACTG-AATCGGATTTTCAAGGGT 120  
 |||  
 Sbjct: 7050 CAATCAGAA-GAACTACAAGAGGCGATT--AGGGT 7081

♦ gb|M61151|ATUAUX Agrobacterium rhizogenes tryptophan oxygenase  
 (aux1) and hydrolase (aux2) genes, complete cds.

Score = 353 bits (178), Expect = 2e-95 Identities = 178/178 (100%)  
 Strand = Plus / Minus

Query: 1 AGGACACTGGGATTCGTCTTGGACAACCTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCAA 60  
 |||  
 Sbjct: 1204 AGGACACTGGGATTCGTCTTGGACAACCTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCAA 1145

Query: 61 CTGGAAACGGGCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGGCCAGA 120  
 |||  
 Sbjct: 1144 CTGGAAACGGGCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGGCCAGA 1085

Query: 121 CCCTTGAAAATCCGATTCAGTACAATCGATTGCCCTCATTTTTACGTTGGCATATATC 178  
 |||  
 Sbjct: 1084 CCCTTGAAAATCCGATTCAGTACAATCGATTGCCCTCATTTTTACGTTGGCATATATC 1027

**Query Sequence: mutant  $\Delta 18-1$ , B33. (Length: 353)**

GenBank|AB009053|AB009053 Arabidopsis thaliana genomic DN... 755 6.0e-28 1  
 GenBank|F14G16|AF147260 Arabidopsis thaliana BAC F14G16... 203 0.0052 1

♦ AB009053|AB009053 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5,

Score = 755 (113.3 bits), Expect = 6.0e-28, P = 6.0e-28  
 Identities = 185/208 (88%), Positives = 185/208 (88%), Strand = Minus / Plus

Query: 353 TTTGCTGAGTGACGTCATATGGCCTGCTGCTGGTTAGTCATTTAAAAAGAATTACTATTT 294  
 |||  
 Sbjct: 6874 TTTGCTGAGTGACGTCATATGGCCTGCTGCTGGTTAGTCATTTAAAAAGAATTACTATTT 6933

```

Query: 293 ACTAATTACTAATTTAGTGATTTAAGATCACAAATTAATTAGTATTTTTTTGTCAAATGC 234
      |||
Sbjct: 6934 ACTAATTACTAATTTAGTGATTTAAGATCACAAATTAATTAGTATTTTTTTGTCAAATGC 6993
      |||
Query: 233 TTTGAGATATATAAATTCCTTTTACTGATATATGC-CAA-CGT-AAAAAT-GAGGGC--AAT 180
      |||
Sbjct: 6994 TTTGAGATATATAAATTCCTTTTACTAATGTTTTCTCGATCGTCAAAAATTGATTGCTCAAT 7053
      |||
Query: 179 C-GATTGTACTG-AATCGGATTTTCAAGGGT 151
      |||
Sbjct: 7054 CAGAA-GAACTACAAGAGGCGATT--AGGGT 7081
      |||

```

♦ **gb|M61151|ATUAUX Agrobacterium rhizogenes tryptophan oxygenase (aux1) and hydrolase (aux2) genes, complete cds.**

Score = 381 bits (192), Expect = e-104 Identities = 192/192 (100%)  
Strand = Plus / Minus

```

Query: 18 CGGCTATTGGTAATAGGACACTGGGATTCGTCTTGGACAACCTTCCTTCTCATCTAAGCG 77
      |||
Sbjct: 1218 CGGCTATTGGTAATAGGACACTGGGATTCGTCTTGGACAACCTTCCTTCTCATCTAAGCG 1159
      |||
Query: 78 TAGACAACCCTCAACTGGAAACGGGCCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAA 137
      |||
Sbjct: 1158 TAGACAACCCTCAACTGGAAACGGGCCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAA 1099
      |||
Query: 138 TAGTTTTGGCCAGACCCTTGAAAATCCGATTCAGTACAATCGATTGCCCTCATTTTTACG 197
      |||
Sbjct: 1098 TAGTTTTGGCCAGACCCTTGAAAATCCGATTCAGTACAATCGATTGCCCTCATTTTTACG 1039
      |||
Query: 198 TTGGCATATATC 209
      |||
Sbjct: 1038 TTGGCATATATC 1027
      |||

```

---

**Query Sequence: mutant Δ18-2, B67. (Length: 388)**

GenBank|AB009053|AB009053 Arabidopsis thaliana genomic DN... 1084 8.2e-43 1  
gb|M61151|ATUAUX Agrobacterium rhizogenes tryptophan oxygena... 335 4e-90

♦ **AB009053|AB009053 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5,**

Score = 1084 (162.6 bits), Expect = 8.2e-43, P = 8.2e-43  
Identities = 220/224 (98%), Positives = 220/224 (98%), Strand = Minus / Plus

```

Query: 388 TGTAACAAACATAGAGGAATTGAATAATCAAAGTAGAAAGTAGTGGTTAGAGGAGATAT 329
      |||
Sbjct: 8197 TGTAACAAACATAGAGGAATTGAATAATCAAAGTAGAAAGTAGTGGTTAGAGGAGACAT 8256
      |||
Query: 328 TTTCCCACTAAGTTCTATATCCATAAGCTAGTTGAAGATTTTCTTCTAATTTTGTCTTG 269
      |||
Sbjct: 8257 TTTCCCACTAAGTTCTATATCCATAAGCTAGTTGAAGATTTTCTTCTAATTTTGTCTTG 8316
      |||
Query: 268 TGCTTACACTTTTCTATGGAATAAATCTAGTGGTCCACTATTTTATCGTTGATTGATACT 209
      |||
Sbjct: 8317 TGCTTACACTTTTCTATGGAATAAATCTAGAGGTCCACTATTTTATCGTTGATTGATACT 8376
      |||

```

Annexes

```
Query: 208 TTCATATATTTGGATAATTAGTCACAACCTATTTAGCCAACGT 165
      |||
Sbjct: 8377 TTCATATATTTGGATAATTAGTCACAACCTATTTAGCCATCTT 8420
```

♦ gb|M61151|ATUAUX *Agrobacterium rhizogenes* tryptophan oxygenase (aux1) and hydrolase (aux2) genes, complete cds.

Score = 335 bits (169), Expect = 4e-90 Identities = 171/172 (99%)  
Strand = Plus / Minus

```
Query: 1 TAGGACTGTTGGTTCGTCCTTGGACAACCTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCA 60
      |||
Sbjct: 1205 TAGGACTGTTGGTTCGTCCTTGGACAACCTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCA 1146
```

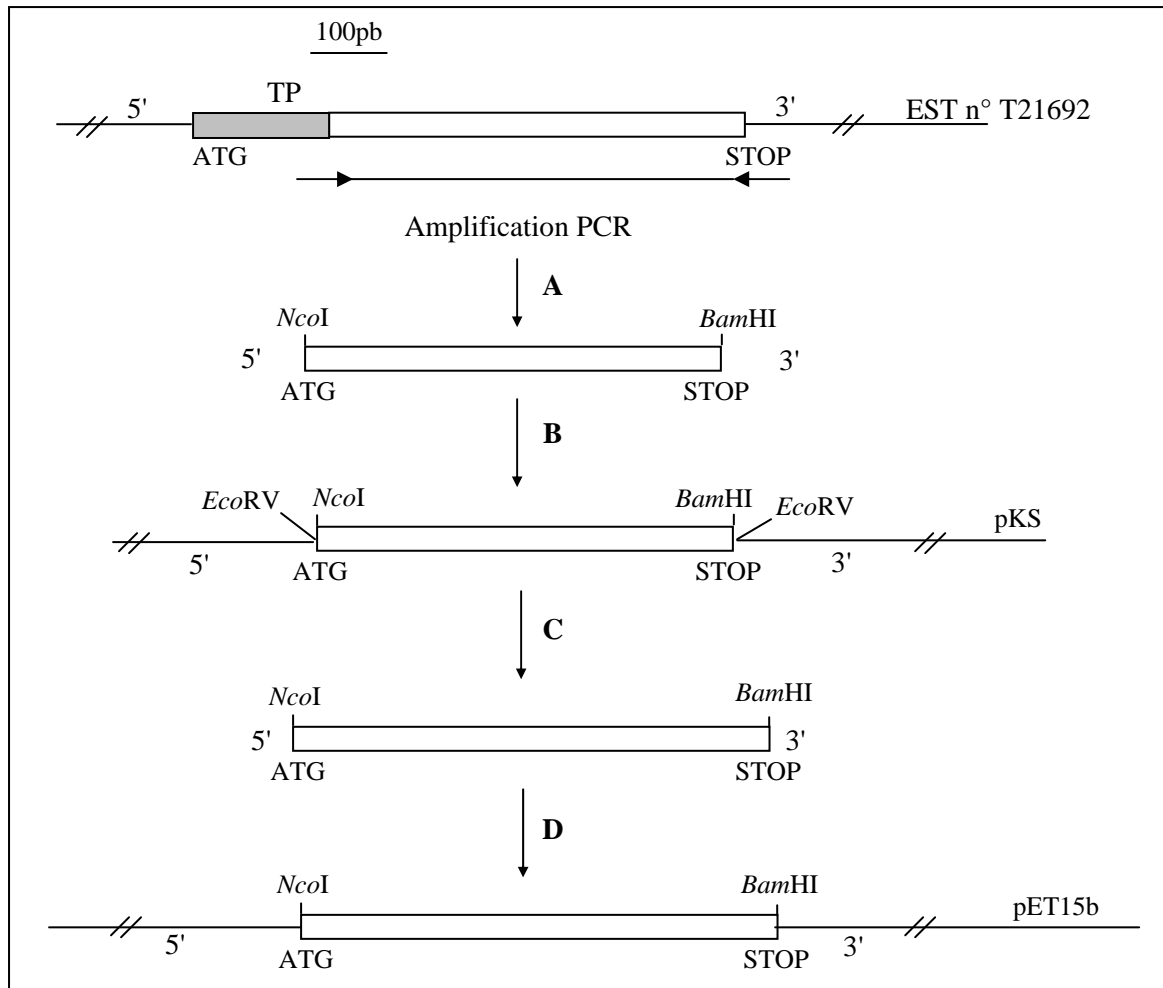
```
Query: 61 ACTGAAACGGGCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGGCCAG 120
      |||
Sbjct: 1145 ACTGAAACGGGCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGGCCAG 1086
```

```
Query: 121 ACCCTTGAAAATCCGATTCAGTACAATCGATNGCCCTCATTTTTACGTTGGC 172
      |||
Sbjct: 1085 ACCCTTGAAAATCCGATTCAGTACAATCGATNGCCCTCATTTTTACGTTGGC 1034
```

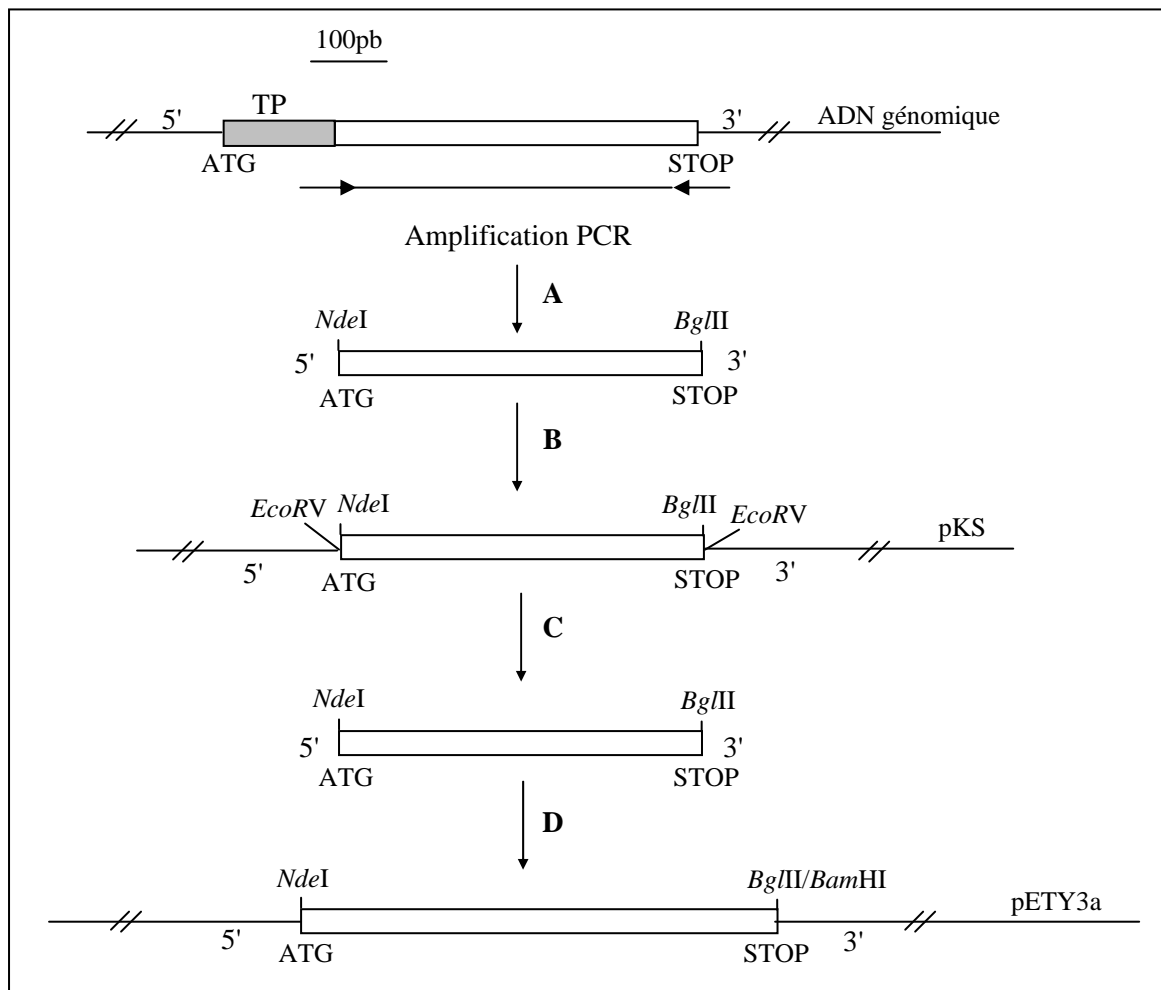
***Annexe 6. Alignements de séquences permettant de confirmer l'identité des fragments amplifiés par PCR lors du criblage de la banque d'insertion d'Arabidopsis pour le gène ie18. Analyses de type BLAST.***



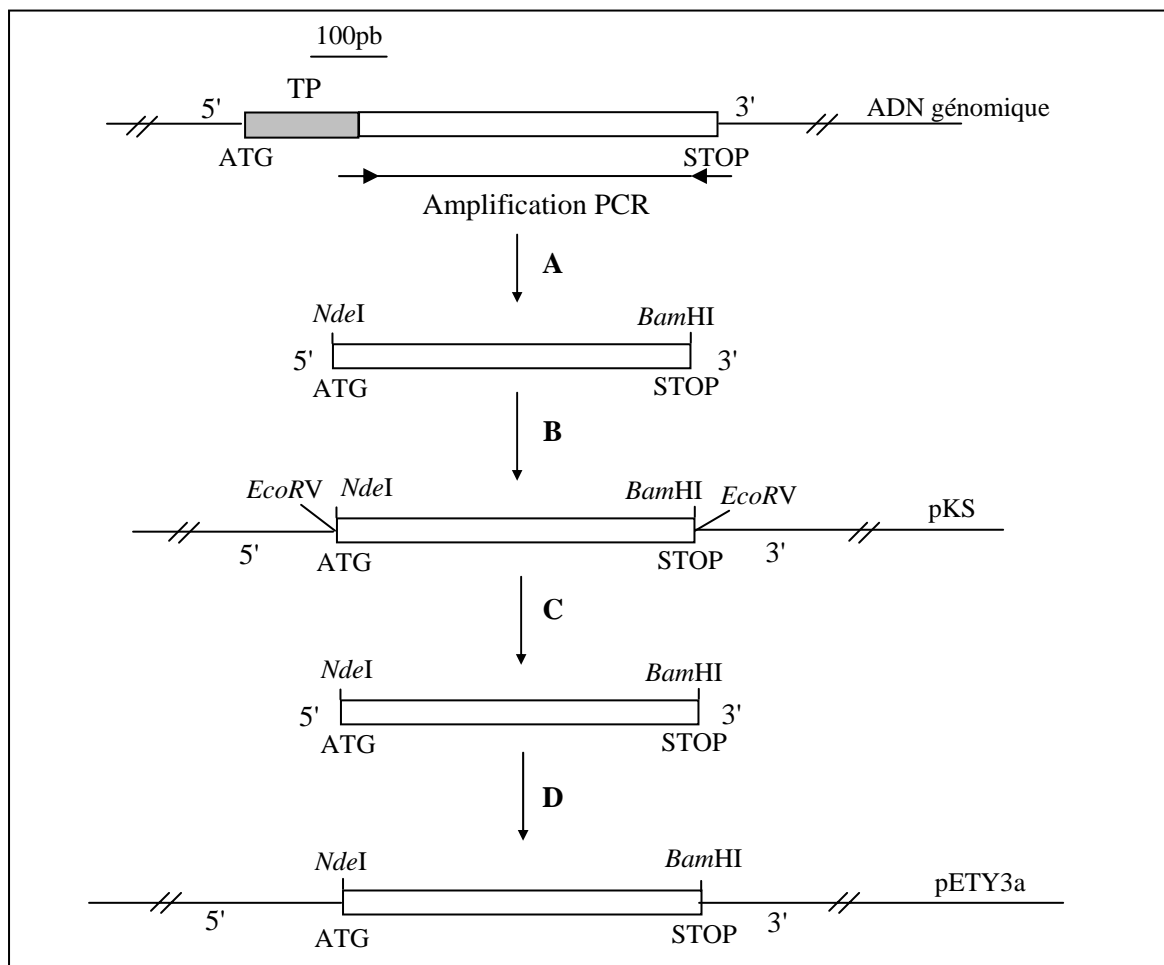




**Annexe 8. Construction du plasmide pET15b/18.** **A.** Amplification par PCR d'un fragment de 552 pb contenant les sites *NcoI* et *BamHI* néoformés. Le peptide de transit putatif (TP, indiqué par le rectangle gris) de la protéine n'est pas inclus dans la construction, il comprend les acides aminés 1 à 60. Les oligonucléotides utilisés contenant les sites de restriction *NcoI* et *BamHI* sont respectivement 5' CGGCCCATGGTAAGTACGGTGGTGGCG 3' et 5' GGTGGATCCTCAAATTTTCATGTTTTCTTC 3'. Ce fragment amplifié est ensuite traité par la Klenow afin d'obtenir des bouts francs. **B.** Ligation du fragment dans le site *EcoRV* du plasmide pBluescript (pKS). A ce stade, l'insert est séquencé. L'insertion du fragment n'est pas orientée dans ce plasmide. **C.** Extraction et purification du fragment *NcoI*-*BamHI*. **D.** Ligation du fragment *NcoI*-*BamHI* dans le plasmide pET15b ouvert au niveau des sites *NcoI* et *BamHI*.



**Annexe 9. Construction du plasmide pETY3a/16-1.** **A.** Amplification par PCR d'un fragment de 480 pb contenant les sites *NdeI* et *BglIII* néoformés. Le peptide de transit (TP, indiqué par le rectangle) de la protéine n'est pas inclus dans la construction, il comprend les acides aminés 1 à 49. Les oligonucléotides utilisés contenant les sites de restriction *NdeI* et *BglIII* sont respectivement 5' TTGACGCATATGGCCTCTACACCCCGACG 3' et 5' TGGAGATCTTTAGAGTTGTCTACCG GCGG 3'. Ce fragment amplifié est ensuite traité par la Klenow afin d'obtenir des bouts francs. **B.** Ligation du fragment dans le site *EcoRV* du plasmide pBluescript (pKS). A ce stade, l'insert est séquencé. **C.** Extraction et purification du fragment *NdeI*-*BglIII*. **D.** Ligation du fragment *NdeI*-*BglIII* dans le plasmide pETY3a ouvert au niveau des sites *NdeI* et *BamHI*. *BglIII* et *BamHI* sont des sites compatibles.



**Annexe 10. Construction du plasmide pETY3a/16-2.** **A.** Amplification par PCR d'un fragment de 474 pb contenant les sites *NdeI* et *BglII* néoformés. Le peptide de transit (TP, indiqué par le rectangle gris) de la protéine n'est pas inclus dans la construction. Il correspond aux résidus 1 à 52. Les oligonucléotides utilisés contenant les sites de restriction *NdeI* et *BamHI* sont respectivement 5' CTCCAACATATGGGTGATGATTCCGT CGATG 3' et 5' ATTGGATCCTCAAAGGACTTGCCT ATCAGC 3'. Ce fragment amplifié est ensuite traité par la Klenow afin d'obtenir des bouts francs. **B.** Ligation non orientée du fragment dans le site *EcoRV* du plasmide pBluescript (pKS). A ce stade, l'insert est séquencé. **C.** Extraction et purification du fragment *NdeI*-*BamHI*. **D.** Ligation du fragment *NdeI*-*BamHI* dans le plasmide pETY3a ouvert au niveau des sites *NdeI* et *BamHI*.

cacaaagaaaatagattcattagtcgataccttgtataaaaactcatgtgtgtaagaaat	-52
attcgatcgcatagagtgtacgaatgggttgattaacaattcacagatgaaaaa <u>atggca</u>	6
	<b>M A</b>
	2
aaaaagaaagcattcactcctcttttctatcttgcacatctatagtatTTTTGCCCTGGTGG	66
<b>K K K A F T P L F Y L A S I V F L P W W</b>	22
atTTCTTCTCAGTTAATAAATGTCTGGAATCTTGGGTTACCAATTGGTGAATACTGGG	126
<b>I S F S V N K C L E S W V T N W W N T G</b>	42
caatccgaaatTTTTTgaataatattcaagaaaagagtccttctagaaaaattcatagaa	186
<b>Q S E I F L N N I Q E K S L L E K F I E</b>	62
ttagaggaactcctcttcttggacgaaatgatcaaggaatactcggaaacacatctcgaa	246
<b>L E E L L F L D E M I K E Y S E T H L E</b>	82
gagtttgggataggaatccataaagaaacgatccaattaatcaagatacaaaatgagaat	306
<b>E F G I G I H K E T I Q L I K I Q N E N</b>	102
cgtatccatacagatTTTGCacttctcgacaaatatcatctgTTTTattattcctaagcggg	366
<b>R I H T I L H F S T N I I C F I I L S G</b>	122
tattcaatTTTGGGtaatgaaaaacttggTattcttaactcttgggctcaggaattccta	426
<b>Y S I L G N E K L V I L N S W A Q E F L</b>	142
tataacttaagtgacacagtaaaagctTTTTctattctTTTattaactgatttatgtatc	486
<b>Y N L S D T V K A F S I L L L T D L C I</b>	162
ggattccattcaccacacggTtgggaattaatgattggctctatctataaagatTTTgga	546
<b>G F H S P H G W E L M I G S I Y K D F G</b>	182
tttgttcataatgatcaaatcatatctggTcttggTttccacTTTccagtcattctcgat	606
<b>F V H N D Q I I S G L V S T F P V I L D</b>	202
acaatTTTTaaatattggatTTTccgTtattTaaatcgtctgtctccgTcacttgtagtt	666
<b>T I F K Y W I F R Y L N R L S P S L V V</b>	222
atTTatcattcaatgaatgactgataaaggatccattgatattaatctaattcaattaga	726
<b>I Y H S M N D -</b>	229
atgcttggTactTTTgtagTtgtacataagcaagTattgaaaatcatatttactctTTct	786
atTTctaaccatcggggagattcatcctatattatttcttagattattccagcaaatagca	846

**Annexe 11. Séquences nucléotidique (Shinozaki et al., 1986) et peptidique déduite du gène de tabac (*Nicotiana tabacum*) codant la protéine ORF229.** La séquence en acides aminés (numérotation indiquée sur la colonne de droite) est donnée au-dessous de la séquence nucléotidique (numérotation indiquée sur la colonne de gauche). Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés.



## PUBLICATIONS

Seigneurin D, Louis J, Seigneurin D (1993) Apport de la classification cytopronostique à la classification histopronostique des cancers du sein. *Bulletin de l'Association des Anatomistes* **77**, 33-36.

Seigneurin D, Grunwald D, Lawrence J-J, Khochbin S (1995) Developmentally regulated chromatin acetylation and histone H<sub>1</sub><sup>0</sup> accumulation. *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 597-603.

Joyard J, Teyssier E, Miège C, Seigneurin-Berny D, Maréchal E, Block MA, Dorne A-J, Rolland N, Ajlani G & Douce R (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.* **118**, 715-723.

Seigneurin-Berny D, Rolland N, Garin J, Joyard J (1999) Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes : a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant Journal.* **19**, 217-228.

Seigneurin-Berny D, Rolland N, Dorne A-J, Joyard J (2000) Sulfolipid triggers the binding of a plant cytosolic annexin to the outer surface of chloroplasts. *soumis*.

### CHAPITRE D'OUVRAGE

Rolland N, Amoroso G, Seigneurin-Berny D, Dorne A-J, Sültemeyer DF, Joyard J, Rochaix J-D (1999). Isolation and characterization of *chlamydomonas* mutants deficient in the plastid *ycf10* open reading frame. In *The chloroplast : from molecular biology to biotechnology*, (J Argyroudi-Akoyunolou and H Senger, eds.) pp. 143-148, *Kluwer Acad. Publ.*

## COMMUNICATIONS ORALES

Plant Biomembrane network. Lac d'Aiguebelette, juin 1996  
Caractérisation de protéines fixant le GTP dans l'enveloppe des chloroplastes d'épinard.  
Seigneurin D, Miège C, Joyard J.

Journée thématique DBMS/IBS "Membranes et compartimentation", novembre 1999  
Recherche de nouveaux systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste  
Seigneurin-Berny D, Rolland N, Garin J, Joyard J.

## PRESENTATION DE POSTER

5<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Physiologie Végétale - Quelles plantes pour demain ? -  
Montpellier, 15-17 juillet 1998  
Recherche de nouveaux systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste.  
Seigneurin-Berny D, Rolland N, Garin J, Joyard J.

---

## **Search for new transport systems across the chloroplast envelope Characterisation of new hydrophobic proteins**

The chloroplast is an organelle totally integrated in the metabolism of the plant cell. It contains its own metabolic pathways like photosynthesis, aminoacid synthesis. The chloroplast is limited by the envelope composed of two membranes and an intermembrane space. Envelope membranes are the site of transport of metabolites, ions, proteins and information between the plastid and the cytosol. Then, they contain many transport systems, but only some of them have been characterised. Hydrophobicity and low representation are the main limitations for the study of these proteins. In order to characterised new transport systems, we have developed an approach that allowed us to identify new proteins.

This approach is based of the hydrophobicity of translocators that allows solubilisation of these proteins in organic solvents. Hydrophobic proteins were differentially extracted in various mixture of chloroform/methanol according to their hydrophobicity. Then, proteins were separated by SDS-PAGE and analysed by microsequencing. Several new proteins were identified including IE16 and IE18, localized in the inner membrane of the chloroplast envelope.

Functional characterisation of these proteins was continued by analysing sequences homologies with proteins of known function. We have also obtained mutants of cyanobacteria and *Arabidopsis thaliana* in which genes coding for IE16 and IE18 are disrupted. The analysis of their phenotypes provide informations on the function of these proteins. In particular, IE18 could be involved in the transport of  $K^+$  and/or  $H^+$ . In addition, these proteins have been expressed in heterologous systems. They are produced in the system baculovirus/insect cells. Their biochemical and electrophysiological characterisation are currently in progress.

One of the proteins extracted in organic solvent was demonstrated to correspond to a 35 kDa annexin. The binding of annexin to chloroplasts and its function were studied. This annexin copurifies with chloroplasts and envelope membranes in the presence of calcium. The sulfolipid, a chloroplast specific lipid, is a high affinity site for interaction with annexin. This protein does not form an ionic channel when integrated in lipidic planar bilayers. This annexin does not possess a peroxydase activity. The signification of the interaction of annexin with the chloroplast envelope remains to be determined.

We have developed an approach that can be used systematically for studying transport in various membranes systems.

---

**DISCIPLINE : BIOLOGIE**

---

**MOTS CLES : enveloppe, chloroplaste, transport, hydrophobicité, solvants organiques, génétique inverse, expression fonctionnelle, annexine, sulfolipide.**

---

**Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale - CEA Grenoble - DBMS - 17 rue des Martyrs - 38054 Grenoble Cedex 9.**

---



---

---

## **Recherche de nouveaux systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste Caractérisation de nouvelles protéines hydrophobes**

Le chloroplaste est un organite totalement intégré dans le métabolisme de la cellule végétale. Il possède des voies métaboliques qui lui sont propres comme la photosynthèse, la synthèse d'acides gras, la synthèse d'acides aminés. Le chloroplaste est limité par l'enveloppe, constituée de deux membranes distinctes et d'un espace intermembranaire. Par sa localisation, l'enveloppe du chloroplaste constitue un site privilégié de transport de métabolites, d'ions, de protéines et d'informations entre le stroma du chloroplaste et le cytosol de la cellule végétale. Ainsi, l'enveloppe doit renfermer de nombreux systèmes de transport permettant ces échanges. Malgré l'importance de ces transporteurs, très peu d'entre eux ont été totalement caractérisés. La limitation principale provient de la très faible représentation de ces protéines et de leur hydrophobicité. Afin de caractériser de nouveaux systèmes de transport, nous avons développé une nouvelle approche qui nous a permis d'identifier de nouvelles protéines. Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation fonctionnelle de ces protéines.

L'approche que nous avons développée repose sur le caractère hydrophobe des transporteurs qui permet de les solubiliser dans des mélanges de solvants organiques, comme le chloroforme/méthanol. Cette approche permet l'extraction de protéines hydrophobes et mineures de l'enveloppe, elle est spécifique de la localisation subcellulaire. D'autre part, suivant leur hydrophobicité, les protéines peuvent être extraites de façon différentielle en fonction des rapports de solvants organiques. Les protéines extraites sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, et analysées par microséquençage. Plusieurs protéines ont été identifiées dont les protéines IE16 et IE18.

Nous avons poursuivi la caractérisation fonctionnelle de IE16 et IE18 en analysant d'une part les homologies de séquences avec des protéines de fonction connue. D'autre part, nous avons obtenu des mutants de cyanobactéries et d'*Arabidopsis thaliana* dont les gènes correspondant aux protéines IE16 et IE18 ont été interrompus. L'analyse des phénotypes peut fournir des informations sur la fonction des protéines mutées. Notamment, la protéine IE18 pourrait être impliquée dans le transport des ions  $K^+$  et/ou  $H^+$ . Afin d'effectuer des analyses biochimiques sur ces protéines, elles ont été exprimées dans des systèmes hétérologues. Ces protéines sont produites dans le système d'expression cellules d'insecte/baculovirus alors qu'aucune expression n'est détectée dans le système *E. coli*. Ces protéines forment des homodimères. Les analyses fonctionnelles par électrophysiologie sont en cours actuellement.

Lors des premiers séquençages des protéines extraites dans les solvants organiques, une séquence correspondant à une annexine a été obtenue. Nous avons poursuivi l'étude de cette protéine. Le sulfolipide, lipide spécifique du plaste, est un site à haute affinité permettant l'interaction de l'annexine avec l'enveloppe. L'annexine copurifie avec les chloroplastes et des vésicules d'enveloppe en présence de calcium. Cette protéine ne forme pas de canal ionique lorsqu'elle est insérée dans des bicouches lipidiques planes. Elle ne présente pas non plus d'activité peroxydase. La signification de son interaction avec l'enveloppe du chloroplaste reste à être déterminée.

L'approche que nous avons développée peut être utilisée de façon systématique pour l'étude des transports dans différents systèmes membranaires.

---

---