

USTL
Laboratoire de Physiologie de la Différenciation et
Biotechnologies Végétales
Equipe de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétales



50376
1998
265

N° attribué par la bibliothèque

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I
Discipline: SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

présentée par

Anne DUMINY-DUBREUCQ

soutenue le 10 Septembre 1998

**CARACTERISATION DES CYTOPLASMES 411, 523 ET 524
PROVENANT DE CHICOREES MALE STERILES TRANSFERES PAR
RETROCROISEMENTS CHEZ LA CHICOREE WITLOOF.
SUIVI DE LEUR DESCENDANCE.**

Directeur de Thèse : J. VASSEUR

JURY

M^{me} M.

J. VASSEUR
A. MOURAS
H. THIELLEMENT
F. BUDAR
F. MONEGER
C. RAMBAUD

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examinatrice



SCD LILLE 1



D 030 258735 6

Je remercie M. J. Vasseur qui m'a permis d'effectuer cette thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie également M. C. Rambaud qui était chargée de m'encadrer et qui a obtenu les chicorées mâle stériles, objet de mon étude.

J'exprime toute ma reconnaissance à M. M. Derieux, instigateur d'une collaboration qui me fut oh!combien précieuse entre le laboratoire de M. Vasseur et le département de Génétique et d'Amélioration des Plantes de l'INRA de Versailles. Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'INRA et de la Région Nord-Pas de Calais.

Je tiens à assurer de ma reconnaissance M. A. Mouras et M. H. Thiellement qui ont accepté la tâche ingrate et fastidieuse de rapporteurs.

Je remercie également M. F. Monéger d'avoir accepté d'être examinatrice lors de ma soutenance. Ses publications concernant la smc du tournesol n'ont pas quitté mon bureau durant mes années de thèse.

Je tiens à assurer M. F. Budar de toute ma gratitude et de mon affection pour l'aide ENORME qu'elle m'a apportée scientifiquement, psychologiquement et humainement. Elle n'aura jamais ménagé sa peine ni son temps, sachant toujours expliquer avec passion et enthousiasme les mille et un secrets de la smc et trouver les paroles gentilles et réconfortantes dans les moments difficiles. Je garderai en mémoire les petits moments de détente et d'euphorie autour du bocal de bonbons alimenté et vidé par les soins de toute l'équipe.

Je remercie vivement M. L. Boulidard qui a effectué tout au long de ces années un travail de sélection avec une rigueur et un courage remarquables et sans qui ce travail aurait été impossible. M. Boulidard n'a jamais ménagé sa peine ni son temps pour m'expliquer les buts et les raisons de ses rétrocroisements oh!combien nombreux, toujours aidé du fidèle Jean-Pierre.

Je tiens également à remercier M. C. Doré pour les conversations intéressantes que nous avons eues et pour la gentillesse avec laquelle elle m'a toujours accueillie à l'MRA de Versailles.

Ma reconnaissance va également à Mathilde qui a accepté, avec la gentillesse et la douceur qui la caractérisent, de corriger le premier jet de ce mémoire. Une pensée émue pour Momo, grand imitateur du chant du coq devant l'éternel, avec qui les synthèses in organello devenaient une partie de plaisir.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de Lille avec une pensée émue pour tous les étudiants qui n'ont pas encore terminé leur thèse ou leur DEA, pour les moments de délire de notre Boys-Band local. J'accorde une mention spéciale à Delphine, Béatrice et Blandine: Delphine qui fut pendant ces années une seconde mère, à qui j'ai fait visiter les centres SOS Mains et autres services lors de mes journées catastrophes, Béatrice pour sa bonne humeur (qui fait preuve d'un caractère certain, je n'ai pas dit d'un certain caractère), son courage et sa volonté et Blandine à qui je souhaite de trouver rapidement du travail. Vous avez toujours répondu présentes dans les moments agréables ainsi que dans les moments difficiles.

Je remercie également toute l'équipe du DGAP grâce à qui règne une ambiance de travail et de bonne humeur extrêmement agréable. J'ai été très très sensible à la gentillesse de Corinne, Catherine, Marie-Christine et Alfred.

Bien sûr, je remercie **ENORMEMENT** toute ma famille ainsi qu'Albert et plus particulièrement mes parents toujours présents et qui m'ont toujours poussé à aller le plus loin possible dans mes études. Ils ont toujours su me soutenir moralement et m'encourager. Sans leur aide financière au cours de cette dernière année, je n'aurais pas pu mener à terme cette thèse. La chanson dit que l'on ne choisit pas ses parents, on choisit pas sa famille, personnellement j'estime avoir été plus que gâtée dans ce domaine. A mon père qui en plaisantant m'a souvent rétorqué, "Tais-toi t'es pas docteur!", j'ai bien envie de répondre, "nous verrons bien!". J'espère que je saurai me montrer à la hauteur.

Je terminerai, enfin, par un remerciement tout particulier, à mon petit mari, Bertrand, la force tranquille, toujours disponible, toujours calme (et il a eu bien des occasions de s'énerver!) toujours prêt à m'aider et à me soutenir psychologiquement. Merci de

m'avoir toujours poussée à continuer mes études. Comme la fin de ta thèse approche, tu pourrais me soumettre au même régime mais je sais que tu seras mieux organisé que moi. j'espère que je saurai me montrer aussi patiente que toi.

1. INTRODUCTION	1
1.1. GÉNÉRALITÉS.....	1
1.1.1. Formation du pollen.....	1
1.1.1.1. Méiose et mitoses polliniques	1
1.1.1.2. Développement coordonné des tissus sporophytiques et gamétophytiques.....	2
1.1.2. La stérilité mâle.....	3
1.1.2.1. Classification phénotypique	3
1.1.2.2. Classification génétique.....	4
1.1.2.2.1. La stérilité mâle nucléaire (smn)	4
1.1.2.2.2. La stérilité mâle cytoplasmique (smc).....	6
1.1.2.2.3. Avantages de la smc par rapport à la smn.....	7
1.2. LA MITOCHONDRIE.....	9
1.2.1. Généralités.....	9
1.2.2. Rôle biochimique de la mitochondrie	10
1.2.3. Le génome mitochondrial	11
1.2.3.1. Taille et structure.....	11
1.2.3.2. Gènes codés par le génome mitochondrial	15
1.2.3.3. Expression du génome mitochondrial des plantes.....	16
1.3. EXEMPLES DE SMC.....	18
1.3.1. Maïs.....	18
1.3.2. Nicotiana.....	21
1.3.3. Brassica.....	22
1.3.4. Petunia	23
1.3.5. Haricot.....	24
1.3.6. Tournesol.....	24
1.4. SMC: CARACTÉRISTIQUES COMMUNES- HYPOTHÈSES SUR LE MÉCANISME	26
1.5. INTÉRÊT DE LA SMC EN RECHERCHE FONDAMENTALE	30
1.6. LA SMC CHEZ LA CHICORÉE.....	31
1.6.1. Présentation du matériel	31
1.6.2. Importance économique de la chicorée (chicorée endive, chicorée industrielle).....	33
1.6.3. Intérêt de la SMC chez la chicorée.....	33
1.7. SITUATION DU SUJET.....	34
1.7.1. Obtention de chicorées mâle stériles.....	34
1.7.2. Choix du tournesol.....	34
1.7.3. Fusions de protoplastes.....	34
1.7.4. Transfert des cytoplasmes 411, 523 et 524 dans différents types de chicorées.....	35
1.7.5. Objectif de la thèse.....	35
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	37
2.1. MATÉRIELS.....	37
2.1.1. Propagation par culture in vitro d'un plante de chaque cytotype: Première série étudiée.	37
2.1.2. Obtention d'une descendance de chaque cytotype dans différents contextes nucléaires, après cinq générations de rétrocroisements: Seconde série étudiée:	38
2.2. MÉTHODES.....	39
2.2.1. Méthodes de biologie moléculaire.....	39
2.2.1.1. Extraction des acides nucléiques	39
2.2.1.1.1. A partir de bactéries - Maxi Préparation d'ADN plasmidique.....	39
2.2.1.1.2. A partir de plantes.....	40
2.2.1.1.2.1. Extraction d'ADN total:	40
2.2.1.1.2.2. Extraction d'ARN totaux.	41
2.2.1.2. Analyse des acides nucléiques	42
2.2.1.2.1. Digestion d'ADN total de plantes	42
2.2.1.2.2. Electrophorèse des gels d'ADN.....	42
2.2.1.2.3. Transfert des gels d'ADN.....	42

2.2.1.2.4.	Electrophorèse des gels d'ARN.....	43
2.2.1.2.5.	Transfert des gels d'ARN.....	44
2.2.1.2.6.	Hybridations.....	44
2.2.1.2.6.1.	Marquage des sondes.....	44
2.2.1.2.6.2.	Préhybridations des membranes.....	44
2.2.1.2.6.3.	Hybridations des membranes.....	45
2.2.1.2.6.4.	Lavage des membranes.....	46
2.2.1.2.6.5.	Déshybridations des membranes.....	46
2.2.1.2.7.	Synthèse d'ADNc par transcription inverse.....	46
2.2.1.2.8.	Amplification en chaîne par polymérase (PCR).....	46
2.2.1.2.9.	Clonage et Séquençage.....	47
2.2.2.	<i>Préparation des sondes mitochondriales</i>	48
2.2.3.	<i>Méthodes d'analyse des protéines</i>	49
2.2.3.1.	Isolement des mitochondries.....	49
2.2.3.2.	Synthèse <i>in organello</i>	50
2.2.3.3.	Séparation des protéines en conditions dénaturantes.....	52
3.	RÉSULTATS	55
3.1.	ARTICLE 1	55
3.1.1.	<i>Résultats complémentaires - Morphologies florales</i>	71
3.1.2.	<i>Discussion</i>	74
3.2.	ARTICLE 2	78
3.2.1.	<i>Résultats complémentaires - Synthèses in organello</i>	93
3.2.2.	<i>Discussion</i>	94
4.	CONCLUSION GÉNÉRALE	97
5.	PERSPECTIVES.....	99
6.	ANNEXE	100
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	101

Abréviations

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNmt : ADN mitochondrial
ADP : adénosine diphosphate
APS : persulfate d'ammonium
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate
BEt : bromure d'éthidium
BSA : sérum albumine bovine
C : cytosine
CaMV : virus de la mosaïque du chou fleur
Ci : curie
cv. : cultivar
dATP : 2'-désoxyadénosine 5' triphosphate
dCTP : 2'-désoxycytosine 5' triphosphate
DEPC : diéthyl-pyrocarbonate
dGTP : 2'-désoxyguanosine 5' triphosphate
DMSO : diméthyl sulfoxyde
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : désoxynucléoside triphosphate (N= A, T, C ou G)
DTT : dithiothréitol
dTTP : 2'-désoxythymidine 5' triphosphate
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA : acide éthylèneglycol-bis- (β-aminoéthyléther)N, N, N', N'- tétraacétique
g : unité de gravitation
G : guanosine
GTP : guanidine 5' triphosphate
h : heure
J : joule
kb : kilobase ou kilo paire de base
kDa : kilo dalton
l : litre
m : mètre
M : mole /l
MES : acide 2 (N-morpholino) éthane sulfonique
mm : millimètre
mM : millimolaire
ml : millilitre
mn : minute
MOPS : acide 3 (N-morpholino) propane sulfonique
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
ng : nanogramme
nt : nucléotides
orf : open reading frame (phase ouverte de lecture)
pb : paire de base
PCR : réaction de polymérase en chaîne
PEG : polyéthylène glycol

pM : picomolaire
PVP : polyvinyl pyrrolidone soluble
qsp : quantité suffisante pour
RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RNase : ribonucléase
rpm : rotation par minute
RT-PCR : transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase
s : seconde
SDS : sodium dodécyl sulfate (lauryl sulfate)
sm : stérilité mâle
smc : stérilité mâle cytoplasmique
smn : stérilité mâle nucléaire
T : thymidine
TAE : tris-acide acétique-EDTA
TE : tris-EDTA
TEMED : N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine
Tris : tris hydroxyméthyl aminométhane
U : unité d'activité enzymatique
urf : unknown reading frame (phase ouverte de lecture inconnue)
U.V. : rayons ultra-violets
V : Volt
var. : variété
µg : micro gramme
µl : micro litre

Analyse Bibliographique

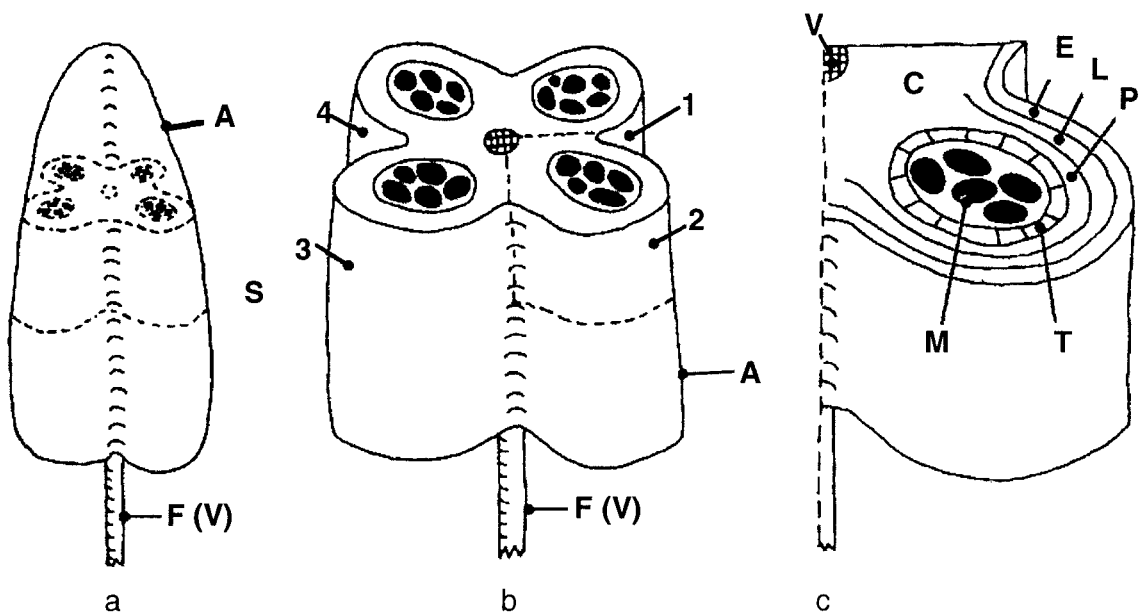


Figure 1a, b, c: Anatomie de l'anthere.

D'après Horner & Palmer, 1995, Crop Science, 35, 1527-1535

Etamine (S), Anthère (A), Tissu vasculaire (V), Filet (F), 4 sacs polliniques (1-4) : Connectif (C)
 Epiderme (E)
 Endothecium (L)
 Tissu pariétal (P)
 Tapis (T)
 Microspore (M)

1. Introduction

1.1. Généralités

1.1.1. Formation du pollen

Chez les Angiospermes, l'androcée est constitué de l'ensemble des étamines qui se développent à partir du troisième primordium du méristème floral, sous l'effet de l'expression de gènes homéotiques. Le développement correct des grains de pollen nécessite une coordination du développement des tissus sporophytiques et gamétophytiques. L'étamine est constituée de l'anthère et du filet (fig. 1a). L'anthère est formée de deux loges, chacune pouvant être séparée en deux sacs polliniques (fig. 1b). Sur une coupe transversale (fig. 1c), on peut observer l'épiderme, l'endothécium, une couche de tissu pariétal, les cellules du tapis et les microspores (après la méiose) qui à maturité donneront les grains de pollen. Les quatre sacs polliniques sont réunis par le tissu sporophytique au milieu duquel on peut observer le connectif correspondant au tissu vasculaire qui se prolonge, vers le bas, dans le filet.

Le développement des anthères peut être divisé, de manière générale, en deux grandes phases. Lors de la première phase, la morphologie de l'anthère s'établit, les tissus se différencient et les méiocytes, après la méiose, donnent naissance aux microspores. La deuxième phase se caractérise par une différenciation des grains de pollen à partir des microspores, par une augmentation de la taille de l'anthère suivies par une dégénérescence de certains tissus. Cette phase s'achève par la déhiscence des anthères, libérant alors les grains de pollen (Goldberg *et al.*, 1993).

1.1.1.1. Méiose et mitoses polliniques

Au sein des cellules du tapis, les cellules du tissu sporogène s'isolent les unes des autres grâce à la synthèse de callose, dupliquent leur ADN ($2C \rightarrow 4C$) et s'arrondissent pour devenir des méiocytes. Les méiocytes subissent alors les deux divisions de la méiose ($4C \rightarrow 2C \rightarrow 1C$) pour former une tétrade de microspores haploïdes (fig. 2a, fig. 3 stade 3 et 4). La callose, qui se dépose de façon centripète, isole les microspores les unes des autres. A la fin du stade tétrade, une paroi commence à se former autour des microspores, elle constituera l'exine des grains de pollen. Puis, le volume des microspores augmente, la callose se dégrade, l'exine s'épaissit et le noyau se déplace vers la paroi (fig. 3, stade 7). La première mitose pollinique donne naissance à la cellule végétative et à la cellule reproductrice qui

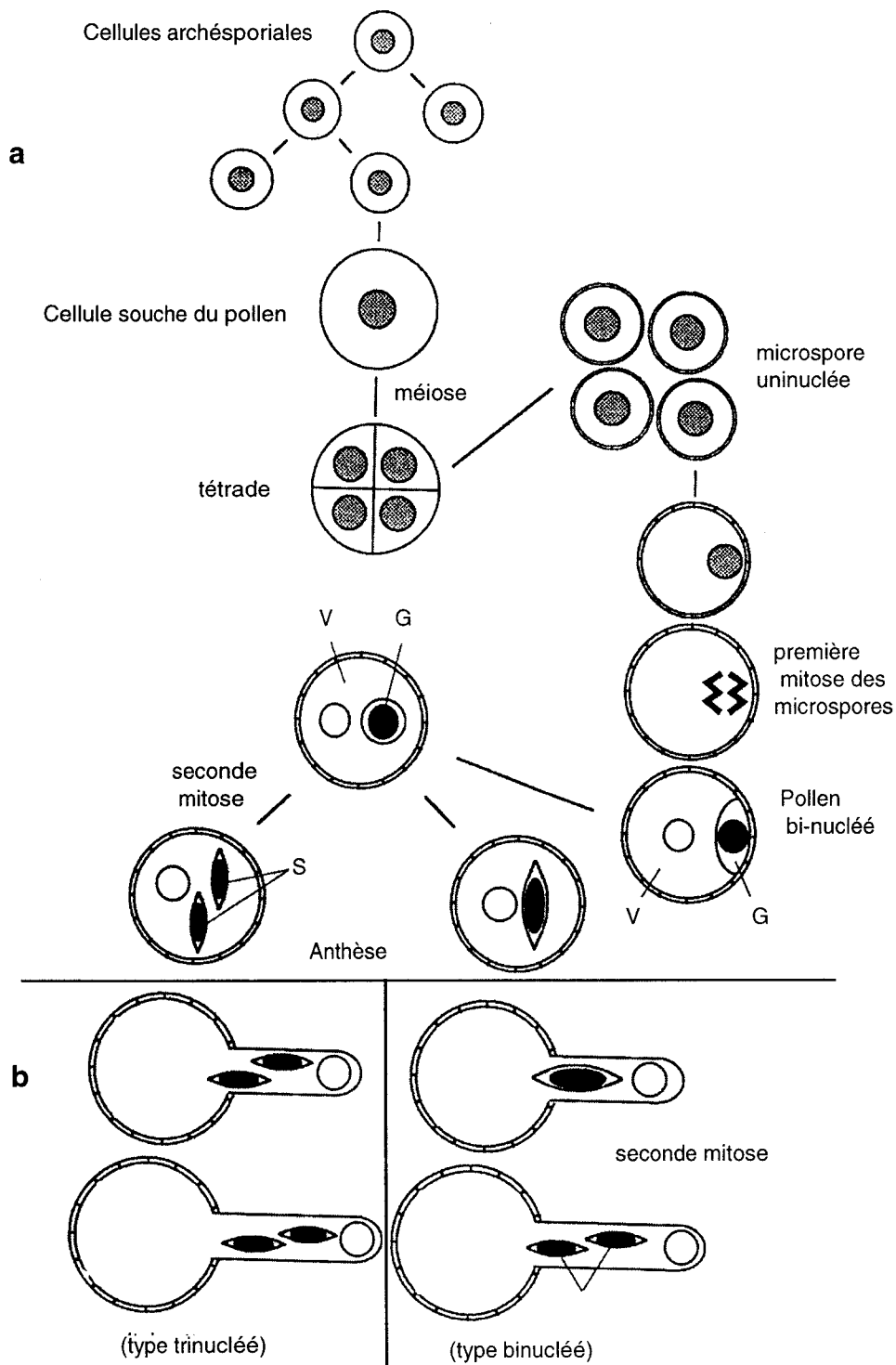


Figure2 a, b: Gamétogenèse mâle chez les Angiospermes. **a:** divisions avant l'anthèse. **b:** divisions après l'anthèse.

d'après TANAKA, 1993, *J. Plant Res.*, 106, 55-63

G: Cellule génératrice
V: Cellule végétative
S: Cellule spermatique

présente une forme allongée en fuseau (fig. 2 a). L'exine continue à s'épaissir et l'intine commence à se former. Le grain de pollen est alors vacuolisé, rempli de réserves (fig. 3, stade 8). La deuxième mitose pollinique, subie par la cellule reproductrice, donne naissance aux deux noyaux reproducteurs, ou gamètes mâles. Elle a lieu, suivant les cas, avant la déhiscence des anthères (pollen tri-nucléé) ou pendant la germination du grain de pollen (pollen bi-nucléé) (fig. 2a, b).

1.1.1.2. Développement coordonné des tissus sporophytiques et gamétophytiques

Le tapis joue un rôle très important dans la formation des grains de pollen. Les cellules qui le composent entourent, en effet, le massif cellulaire qui donne naissance aux grains de pollen. De ce fait, tous les échanges de composés, réalisés entre le tissu sporophytique et le tissu gamétophytique, s'effectuent via le tapis. Beaucoup de mutations provoquant la stérilité mâle agissent au niveau de la différenciation et/ou de la fonction des cellules du tapis, indiquant que ce tissu est essentiel pour la production de pollen fonctionnel (Kaul, 1988). D'autre part, l'obtention de colzas transgéniques mâle stériles, exprimant un gène cytotoxique spécifiquement dans les cellules du tapis (Mariani *et al.*, 1990), montre l'importance du tapis pour le développement du pollen.

Du stade méiocyte au stade tétrade, les cellules du tapis sont le siège d'une intense synthèse d'ARN et de protéines. Au moment de la méiose, elles deviennent très souvent polyploïdes. Leur aspect évolue d'un type méristématique (avant la méiose) vers un type cellule polarisée sécrétrice (Horner et Palmer, 1995).

Les cellules du tapis fournissent des sucres et des acides aminés qui permettent une nutrition des microspores. Elles sécrètent aussi des enzymes telles que la callase qui dégrade la callose entourant les tétrades, permettant ainsi une individualisation des microspores. Les cellules du tapis participent également à la formation de l'exine en fournissant des enzymes nécessaires à sa synthèse ainsi que des précurseurs. Elles synthétisent des substances lipidiques qui se déposent à la surface des grains de pollen permettant leur protection vis-à-vis de la déshydratation. Enfin, elles sécrètent des protéines impliquées dans la réhydratation du grain de pollen pendant la germination et la croissance du tube pollinique (Schrauwen *et al.*, 1996).

Au niveau cellulaire, Warkme et Lee (1979) ont observé au cours du développement des microspores et du tapis, une augmentation du nombre des mitochondries. D'autre part, une étude effectuée sur de nombreux mutants homéotiques-like de tabacs, affectés dans le développement des anthères, a montré que ces plantes présentaient des altérations au niveau

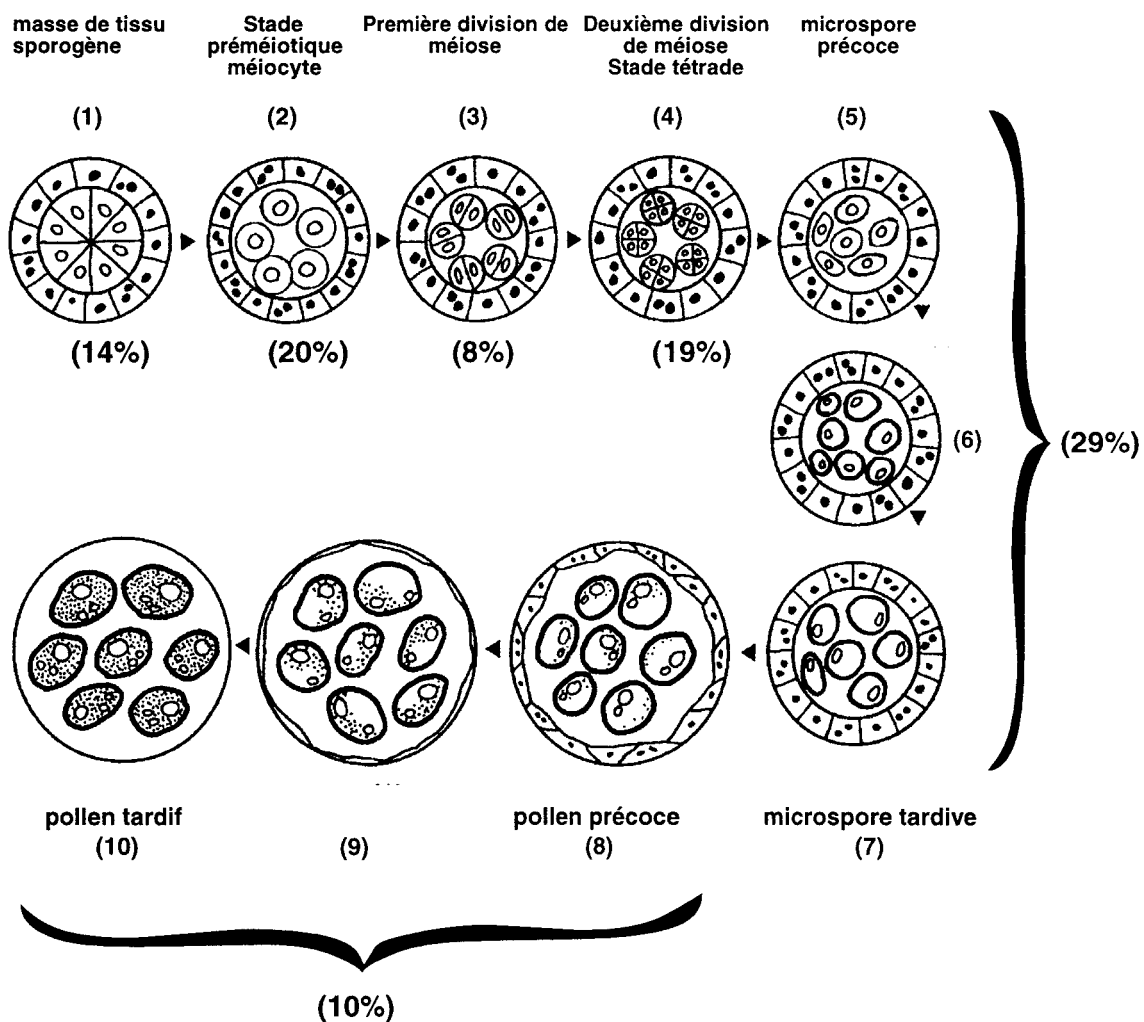


Figure 3 : Stades de développement des gamètes mâles et des cellules du tapis.

D'après Horner & Palmer, 1995, Crop Science, 35, 1527-1535

Les pourcentages entre parenthèses indiquent le pourcentage de mutants mâle stériles trouvés pour chaque stade de développement.

de fragments spécifiques de leur ADN mitochondrial (ADNmt) transmises de façon maternelle (Kofer *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que la mitochondrie et le génome mitochondrial jouent un rôle important dans le processus de différenciation des anthères. Les effets variables du génome mitochondrial sur le développement des étamines, en fonction du contexte nucléaire, suggèrent également que des interactions entre gènes mitochondriaux et nucléaires ont lieu après la spécification des primordia des étamines (Rosenberg et Bonnett, 1983).

1.1.2.La stérilité mâle

La reproduction sexuée est un événement majeur dans le développement d'une plante. Elle nécessite des interactions entre le gamétophyte mâle et le gamétophyte femelle. L'efficacité de cette interaction dépend largement de la qualité et de la viabilité du pollen. Pour que la fécondation ait lieu, il faut que les grains de pollen se soient correctement développés, qu'ils soient libérés pour venir au contact du stigmate d'une fleur. Ce processus nécessite donc la déhiscence des anthères qui libèrent alors le pollen. Une fois sur le stigmate, le grain de pollen doit être capable de germer pour effectuer la double fécondation.

Chez les plantes à fleurs, la stérilité mâle peut être définie comme une incapacité à effectuer la fécondation. Dans les programmes d'amélioration des plantes, les plantes mâle stériles permettent de s'affranchir des étapes coûteuses de castrations pour la production d'hybrides.

Les stérilités mâles (sm) peuvent être classées de deux façons différentes :

- En fonction de l'anomalie phénotypique observée et aboutissant à l'incapacité de la plante à assurer la fécondation (Kaul, 1988).
- En fonction du mode d'héritabilité de cette stérilité mâle.

1.1.2.1.Classification phénotypique

La stérilité mâle sporogène se caractérise par un développement morpho-giquement normal des étamines mais par un développement anormal des microspores pendant la microsporogénèse.

La stérilité mâle structurelle est caractérisée par une microsporogénèse incomplète ou par une absence totale de développement d'anthère.

La stérilité mâle fonctionnelle est caractérisée par un développement normal de l'anthère et des grains de pollen, le pollen est cependant incapable d'assurer la fécondation pour des

raisons diverses. Les anthères peuvent être non déhiscentes. Les grains de pollen peuvent être incapables de germer sur un stigmate.

1.1.2.2. Classification génétique

La stérilité mâle peut également être classée en fonction de son mode d'hérédité : la stérilité mâle nucléaire (smn) est héritée de façon mendélienne et la stérilité mâle cytoplasmique (smc) est héritée de façon maternelle. Les croisements entre les plantes mâle stériles, utilisés comme parent femelle, avec des pollinisateurs permettent d'étudier la ségrégation du caractère mâle stérile dans la descendance et ainsi de déterminer la nature de la stérilité mâle étudiée : nucléaire ou cytoplasmique.

1.1.2.2.1. La stérilité mâle nucléaire (smn)

La stérilité mâle nucléaire est gouvernée par des gènes nucléaires, en général récessifs (Horner et Palmer, 1995). Elle peut apparaître à la suite de mutations de gènes nucléaires spontanées ou induites par des agents mutagènes (chimiques ou physiques). Dans le cas de smn obtenues par mutagenèse, la stérilité mâle est récessive. Les gènes mutés peuvent exercer leur action sur différentes cellules cibles (cellule sporogènes ou cellules du tapis) et induisent une interruption du développement normal des gamètes mâles à différents stades de la microsporogénèse. La figure 3 indique le pourcentage de mutants mâle stériles trouvés pour chaque stade de développement des gamètes mâles.

Dans le but d'essayer de comprendre le mécanisme conduisant à la smn, des études ont été menées pour essayer de trouver des gènes nucléaires dont l'expression est très fortement liée aux anthères. Parmi les nombreux ARNm contenus dans les grains de pollen, correspondant à l'expression de 25 000 gènes différents, environ 2 500 seraient transcrits très fortement dans le pollen et non dans le tissu sporophytique (Mascarenhas, 1990). Des recherches basées sur des comparaisons de séquences peptidiques déduites de banque d'ADNc, provenant d'ARNm trouvés principalement dans les grains de pollen, ont permis de déterminer des fonctions variées de protéines dont deux principales correspondent à des enzymes intervenant dans la dégradation des pectines et des profilines qui régulent la polymérisation de l'actine.

Parmi les smn provoquées par des mutations, on observe souvent des anomalies dans le développement du tapis des anthères. Les cellules du tapis constituent donc une cible de choix pour la production de plantes mâle stériles. Les énormes progrès réalisés ces dernières années en biologie moléculaire ont permis l'induction de différentes smn par transgénèse. Dans ce cas, la smn est dominante. Différentes stratégies ont été élaborées dans le but de

produire des plantes transgéniques mâle stériles exprimant des enzymes dégradant les cellules du tapis ou des ARNm antisens des ARNm d'enzymes spécifiques du tapis (Zabaleta *et al.*, 1996). Nous citerons, de manière non exhaustive, le système barnase-bastar (Mariani *et al.*, 1990, Mariani *et al.*, 1992) et le système "*atp9* non édité" (Hernould *et al.*, 1993, Zabaleta *et al.*, 1996).

- barnase-bastar: Mariani *et al.* (1990) ont produit des tabacs et des colzas mâle stériles en induisant spécifiquement la destruction des cellules du tapis par l'expression d'un gène codant une RNase bactérienne. Le gène codant la barnase, une RNase d'*Aspergillus amyloliquefaciens*, a été fusionné à la région 5' du gène *TA29* du tabac contenant la séquence permettant une expression tapis-spécifique de ce gène. Parmi les transformants régénérés, 92 % étaient mâle stériles mais ne présentaient pas d'autres symptômes. Par la suite, d'autres colzas ont été transformés par une construction constituée cette fois du même promoteur fusionné avec le gène bastar, un inhibiteur de la barnase. Des croisements entre les colzas porteurs du gène barnase (mâle stériles) et des colzas porteurs du gène bastar tous deux sous le contrôle du promoteur *TA29*, ont produit des hybrides fertiles (Mariani *et al.*, 1992). Ces résultats montrent qu'une destruction ciblée des ARNm des cellules du tapis conduit à une interruption du développement des grains de pollen et que le tapis est essentiel pour un développement normal du pollen (Mariani *et al.*, 1990).

- *Atp9* non édité :

Des tabacs transgéniques mâle stériles ont été obtenus en transformant des tabacs par une construction contenant le gène mitochondrial *atp9* non édité du blé, en présence de la séquence d'adressage à la mitochondrie du gène *coxIV* de la levure, précédé du promoteur 35S CaMV du chou-fleur (Hernould *et al.*, 1993). Dans la plupart des cas, l'édition, dans les mitochondries de plantes, est un mécanisme post-transcriptionnel consistant en une substitution des résidus cytidine (C) en résidus uridine (U). Les plantes transformées ont été sélectionnées grâce à une résistance à l'hygromycine conférée par le gène *hpt* porté par le plasmide utilisé pour réaliser les transformations. Les analyses ont permis de corréler l'apparition du phénotype mâle stérile directement à l'expression du transgène comportant la séquence non éditée de l'*atp9* (*u-atp9*). Les tabacs mâle stériles transgéniques ne présentaient pas de différence au niveau du développement des autres organes par rapport au témoin fertile. Des tabacs ont également été transformés par une construction semblable mais exprimant cette fois l'ARNm antisens du gène *atp9* (Zabaleta *et al.*, 1996). Des croisements effectués entre des tabacs mâle stériles exprimant la séquence non éditée du gène *atp9* et des tabacs exprimant l'ARNm antisens de ce même gène, ont permis de restaurer la fertilité. Une analyse de la descendance a permis de déterminer que les lignées porteuses du gène *atp9*

antisens (*as-atp9*) peuvent être considérées comme des lignées restauratrices, et que l'action du gène *as-atp9* est dominante. Hernould *et al.* (1993) et Zabaleta *et al.* (1996) émettent l'hypothèse que la protéine correspondant à la séquence non éditée du gène mitochondrial *atp9* pourrait entrer en compétition avec la protéine endogène. De cette compétition résulterait la formation d'ATPases non fonctionnelles contenant la protéine U-ATP9 et donc une moindre production d'ATP. Comme les besoins en ATP semblent très importants lors de la microsporogénèse, la stérilité mâle pourrait être une conséquence de la baisse de production d'ATP. Cette étude permet de mettre en évidence l'importance de la sous-unité ATP9 de l'ATPase. Elle permet également de mettre l'accent sur l'importance du mécanisme de l'édition dans les mitochondries.

1.1.2.2.2. La stérilité mâle cytoplasmique (*smc*)

La *smc* a été observée chez environ 150 espèces. L'hérédité maternelle de la *smc* suggère un déterminisme cytoplasmique. Elle est souvent associée à la présence, dans le génome mitochondrial, de phases ouvertes de lecture contenant des gènes chimériques. Dans les *smc* étudiées, des ARNm, correspondant à l'expression de ces gènes chimériques, sont traduits en protéines qui semblent interférer avec le fonctionnement mitochondrial et la formation du pollen (Schnable et Wise, 1998). Dans le cas où des lignées, utilisées pour polliniser les plantes mâle stériles, restaurent la fertilité, les études ont montré que ces lignées portent des gènes nucléaires de restauration (*Rf* ou *Fr*) le plus souvent dominants. Quelques cas particuliers de *smc* ont été identifiés. Une lignée alloplasmique mâle stérile de sorgho présente des profils de restriction d'ADN chloroplastiques particuliers ainsi que deux polypeptides nouveaux en synthèse *in organello* (Dixon et Leaver, 1982). Deux autres lignées mâle stériles ont montré la présence de deux particules mitochondriales de type plasmidique (Dixon et Leaver, 1982). Finalement l'apparition de la *smc* dans des lignées de féverole porteuses du cytoplasme 447 a été associée à la présence de particules de type viral contenant de l'ARN double brin associé à une ARN polymérase-ARN dépendante (Lefebvre *et al.*, 1990). Cependant, ces exemples constituent des exceptions, la majorité des *smc* étudiées pouvant être associées à des séquences particulières d'ADNmt.

Les études visant à identifier les déterminants des *smc* sont basées sur des observations comparées du génome mitochondrial et de son expression entre les plantes fertiles, mâle stériles, restaurées et révertantes (quand elles existent).

La *smc* peut apparaître spontanément ou à la suite de croisements intraspécifiques, interspécifiques et intergénériques, des rétrocroisements successifs pouvant aboutir au remplacement du noyau du parent femelle par le noyau du parent mâle dans le cytoplasme du

parent femelle. Cela, dans certains cas, entraîne l'apparition d'une smc. Il est admis que la smc trouverait alors son origine dans un dysfonctionnement entre les mitochondries et le noyau. Dans ce cas, on parle de stérilité mâle nucléo-cytoplasmique. Des rétrocroisements successifs peuvent également aboutir à l'expression d'une smc dont les déterminants cytoplasmiques, présents à l'origine dans la lignée femelle, ne pouvaient pas s'exprimer lorsqu'ils étaient placés dans un contexte nucléaire contenant les gènes de restauration de cette smc. La smc a également pu être observée à la suite de régénération de plantes provenant de cellules ayant été maintenues longtemps en conditions de culture *in vitro* (Phillips *et al.*, 1994). Des croisements entre espèces incompatibles, suivis de sauvetage d'embryons et l'hybridation somatique par fusions de protoplastes permettent la régénération de plantes issues de croisements naturellement impossibles à réaliser. Ces techniques peuvent aboutir à la production de plantes mâle stériles. A l'issue de sauvetage d'embryons, les smc obtenues peuvent être interprétées en termes d'incompatibilité entre le noyau et le cytoplasme. Les smc induites par fusions de protoplastes peuvent présenter un déterminisme très complexe. En effet, après la fusion, il est possible de régénérer des plantes présentant le noyau d'un des parents et un cytoplasme contenant des mitochondries dont les génomes sont issus de recombinaisons entre les génomes mitochondriaux parentaux. Par le biais de ces recombinaisons, certains gènes mitochondriaux d'un des parents de fusion peuvent se retrouver dans le contexte nucléaire de l'autre parent de fusion, créant ainsi une situation d'alloplasmie en une seule génération. Ce résultat a été obtenu lors de fusions entre des protoplastes de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.) et des protoplastes de *Solanum acaule* L. ou de *Solanum tuberosum* L. dont le noyau avait été inactivé par irradiations aux rayons X (Melchers *et al.*, 1992). Les fusions de protoplastes peuvent également être utilisées pour transférer les déterminants d'une smc d'une espèce à une autre (tabac : Belliard *et al.*, 1978, pétunia : Izhar *et al.*, 1983, carotte : Tanno-Suenaga *et al.*, 1988, riz : Kyoizuka *et al.*, 1989).

Les différences morphologiques entre les plantes mâle stériles, présentant une smc, et les plantes fertiles peuvent être observées, dans les étamines, à différents stades et dans différents tissus. Toutefois, une dégénérescence précoce du tapis des anthères a souvent été observée dans les modèles étudiés. Cette observation confirme l'importance du tapis pour un développement correct du pollen.

1.1.2.3. Avantages de la smc par rapport à la smn

La stérilité mâle, dans les programmes d'amélioration des plantes cultivées, assure un contrôle total de l'hybridation. Ceux-ci présentent une vigueur hybride que l'on peut expliquer par le phénomène d'hétérosis. Les hybrides associent les caractéristiques

agronomiques de chacun des parents et présentent souvent par rapport aux parents utilisés dans le croisement une meilleure productivité, une résistance accrue aux maladies et une tolérance plus grande vis-à-vis des effets de l'environnement. Cependant, l'utilisation de la stérilité mâle est limitée aux espèces chez lesquelles une stérilité mâle a déjà été observée. La mise au point de stratégies permettant d'induire la sm est donc d'une importance majeure pour les programmes d'amélioration variétale. Jusqu'à présent les hybridations interspécifiques et les fusions de protoplastes ont permis de transférer des smc dans des espèces ne présentant pas ces smc, ou d'induire où révéler de nouvelles smc. Les techniques de transformations de plantes devraient permettre d'induire de nouvelles smn lorsque les hybridations interspécifiques et les fusions de protoplastes ne peuvent pas être envisagées.

Le problème majeur de la smn réside dans la ségrégation du caractère au cours des générations, qui contraint les sélectionneurs à effectuer des schémas de sélection très complexes. En effet dans le cas de smn provenant de mutations récessives, l'obtention de plantes mâle stériles nécessite la production de plantes homozygotes pour la mutation. Il faut donc un parent femelle homozygote pour l'allèle muté et un parent mâle nécessairement hétérozygote pour la mutation. Le croisement donnera lieu à une ségrégation 1 : 1 pour la stérilité mâle. Dans ce cas, seulement 50 % des plantes issues de ce croisement pourront être utilisées pour la production d'hybrides F_1 , qui seront tous fertiles si le pollinisateur est de type sauvage. Il faut donc effectuer un tri dans le champ parmi les plantes obtenues pour ne conserver que les plantes mâle stériles utilisables pour la production d'hybrides. Dans le cas d'une smn obtenue par transgénèse, l'introduction d'une séquence codant pour une protéine qui n'existe pas chez la plante sauvage peut être considérée comme un gain de fonction. D'autre part les constructions utilisent des promoteurs forts. Ces deux éléments entraînent l'expression systématique, dans un système fonctionnel, de la nouvelles protéine qui induit la stérilité, faisant des stérilités mâle (nucléaire) obtenues par transgénèse des stérilité mâles dominantes. Ces smn présentent donc l'avantage par rapport aux smn récessives d'être exprimées à l'état hémizygote. Cependant pour la production de semences mâle stériles, le parent femelle hémizygote doit obligatoirement être croisé avec un parent mâle ne portant pas cette mutation, puisqu'il doit être mâle fertile. Les plantes issues de ce croisement ségrègent donc 1 : 1 pour le caractère mâle stérile. Il faut donc également effectuer un tri parmi les plantes issues de ce croisement. Le système "barnase" a été utilisé conjointement à une résistance à un herbicide permettant, par l'emploi de l'herbicide correspondant, l'élimination des plantes ne portant ni le gène de résistance, ni le gène barnase. Les plantes mâle stériles, ainsi obtenues directement au champ, sont utilisées comment parent femelle pour la production d'hybrides F_1 qui ségrègent pour le caractère mâle stérile.

En raison des problèmes de ségrégation rencontrés dans la smn, celle-ci est utilisée chez des espèces où aucune smc n'existe ou lorsque des lignées possédant les gènes de restauration de cette smc n'ont pas encore été identifiés (Vedel *et al.*, 1994).

Dans les cas où la smc est utilisée, les plantes mâle stériles sont plantées en champ en alternance avec des plantes mâle fertiles qui serviront de pollinisateurs. En raison de l'hérédité maternelle de cette stérilité mâle, si le pollinisateur utilisé est dépourvu de gènes nucléaires de restauration de fertilité, toutes les graines récoltées donneront des plantes mâle stériles donc incapables de s'autoféconder. Les pollinisateurs ne restaurant pas la fertilité mâle sont appelés mainteneurs et contiennent des gènes nucléaires de maintien de la stérilité mâle. Les lignées mainteneuses sont utilisées pour la production de plantes mâle stériles contenant le cytoplasme inducteur de la smc. Par contre l'existence de gènes (nucléaires) de restauration permet l'utilisation de la smc dans les programmes d'amélioration variétale. En effet, les graines récoltées sur les plantes mâles stériles, issues d'une fécondation croisée par la lignée restauratrice, engendreront la génération F_1 , dont la fertilité mâle est restaurée, porteuse du cytoplasme inducteur de stérilité. Les smc, chez lesquelles des lignées restauratrices ont été trouvées, peuvent être utilisées dans les cas d'espèces cultivées pour leurs graines ou pour leurs fruits.

1.2. La mitochondrie

1.2.1. Généralités

La mitochondrie trouverait son origine dans une endosymbiose où l'ancêtre de la cellule eucaryote aurait endocyté une eubactérie (Martin et Müller, 1998). Les mitochondries sont contenues dans le cytoplasme des cellules eucaryotes en nombre variable suivant la cellule considérée et le stade de développement de la plante. La mitochondrie mesure de 1 à 2 μm de diamètre, est entourée par deux membranes concentriques interne et externe qui délimitent un espace inter-membranaire et un espace interne, la matrice. La membrane externe est perméable aux molécules dont la taille est égale ou inférieure à 3 kDa, la membrane interne présente de nombreuses crêtes et constitue une barrière moléculaire, les molécules pouvant la franchir le faisant par des systèmes de transport actif et sélectif (Siedow et Umbach, 1995). La matrice contient de l'ADN mitochondrial (ADNmt), des ARN mitochondriaux (ARNmt), des protéines codées par le génome mitochondrial et par le génome nucléaire. Les mitochondries sont le siège de nombreuses réactions biochimiques : cycle de Krebs, chaîne de transport des électrons et synthèse d'ATP. De ce fait, cet organite contient de nombreuses enzymes, tant dans la matrice que dans la membrane interne, qui sont composées de différentes sous-unités

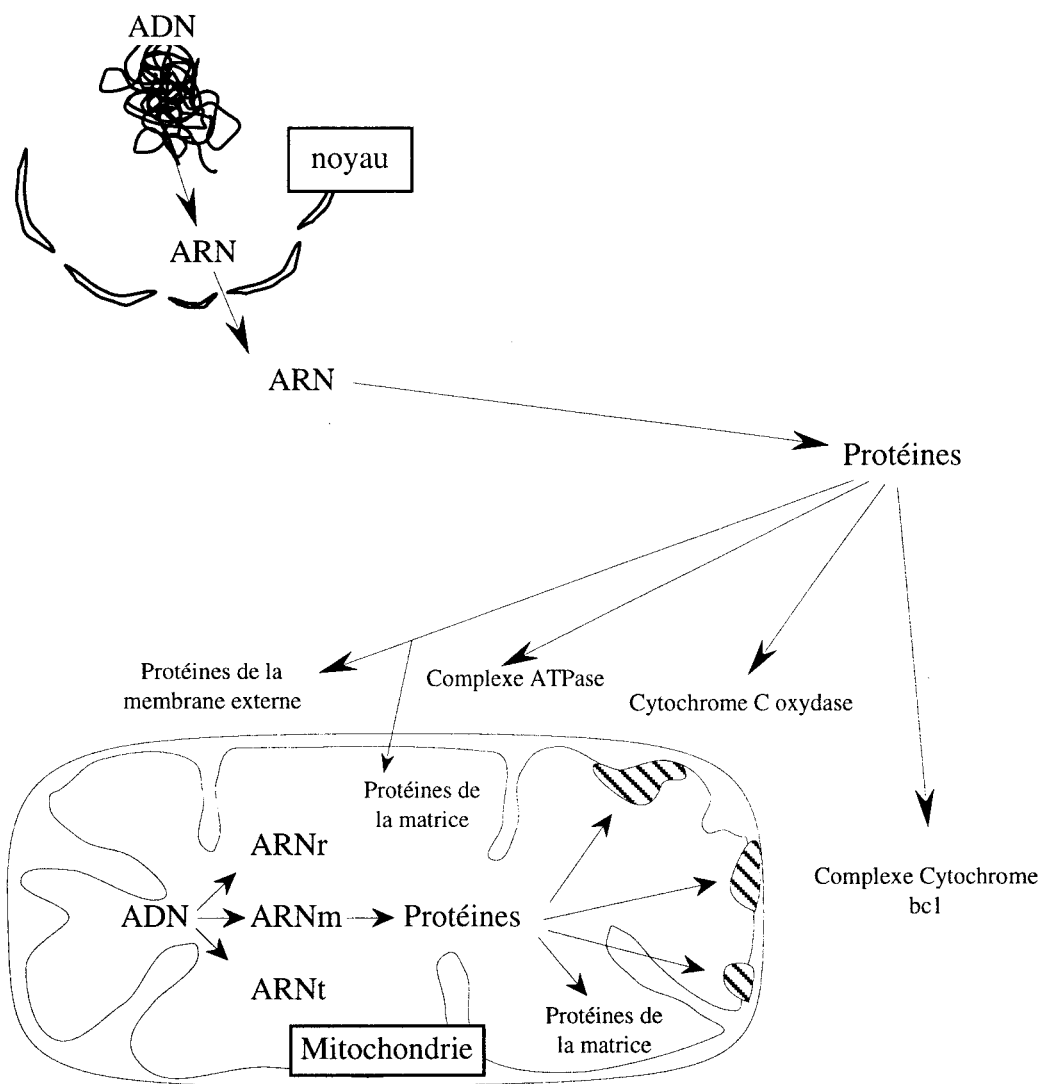


Figure 4: Exemples d'expression coordonnée de gènes nucléaires et mitochondriaux pour la synthèse de complexes enzymatiques mitochondriaux.

codées soit par le génome mitochondrial soit par le génome nucléaire (fig. 4). Les gènes nucléaires codant pour des enzymes mitochondriales sont transcrits dans le noyau, les ARNm sont traduits dans le cytoplasme, les polypeptides sont alors adressés spécifiquement dans la mitochondrie grâce à un peptide signal généralement en position N-terminale.

La biogenèse des mitochondries est contrôlée tant par des gènes mitochondriaux que par des gènes nucléaires. Les mitochondries possèdent certains des outils moléculaires nécessaires pour la synthèse des protéines codées par le génome mitochondrial. Cependant, la majorité des protéines responsables de la maintenance et de l'expression du génome mitochondrial (réplication de l'ADNmt, transcription, maturation des ARN et traduction) est codée par le noyau. De ce fait, même si la mitochondrie peut apparaître comme présentant des éléments lui permettant une indépendance vis-à-vis du noyau, cette dernière est toute relative. En effet, un bon fonctionnement cellulaire requiert une très bonne coordination entre le noyau, les mitochondries et les chloroplastes dans le cas des cellules végétales (Newton, 1988).

On rencontre de nombreux cas où l'hérédité des mitochondries est maternelle mais des cas d'hérédité paternelle ont été décrits chez les végétaux (Reboud et Zeyl, 1994). L'hérédité maternelle éviterait un conflit entre les génomes cytoplasmiques. La polarisation prémitotique de la cellule générative pourrait être le mécanisme conduisant à une répartition inégale des organites cytoplasmiques dans les cellules filles (Reboud et Zeyl, 1994). Des études effectuées sur *Chlamydomonas reinhardtii* suggèrent que les organites cytoplasmiques de l'un des parents pourraient être détruits sélectivement, après la fusion des gamètes, par un mécanisme actif (Harris, 1989). Il semble que les gènes contrôlant l'hérédité des organites cytoplasmiques soient nucléaires, ces gènes étant exprimés par la lignée paternelle, ou maternelle ou par les deux parents (Reboud et Zeyl, 1994). L'hérédité uniparentale conduit à une reproduction clonale du génome cytoplasmique. Ce processus est très surprenant car il peut conduire à l'accumulation de mutations entraînant une diminution de la valeur sélective. Cependant, comme la mitochondrie est le siège de nombreux événements de recombinaison (Bonen et Brown, 1993), l'héritabilité biparentale comme mécanisme conduisant, par le biais de recombinaisons entre les génomes paternel et maternel, à des réparations des mutations, n'est peut-être pas nécessaire dans ce cas (Reboud et Zeyl, 1994).

1.2.2. Rôle biochimique de la mitochondrie

La mitochondrie joue un rôle crucial au niveau du métabolisme cellulaire puisqu'elle est le siège de la respiration cellulaire. Cette dernière constitue une interface entre trois voies majeures du métabolisme : la glycolyse, le cycle de Krebs (ou cycle des acides

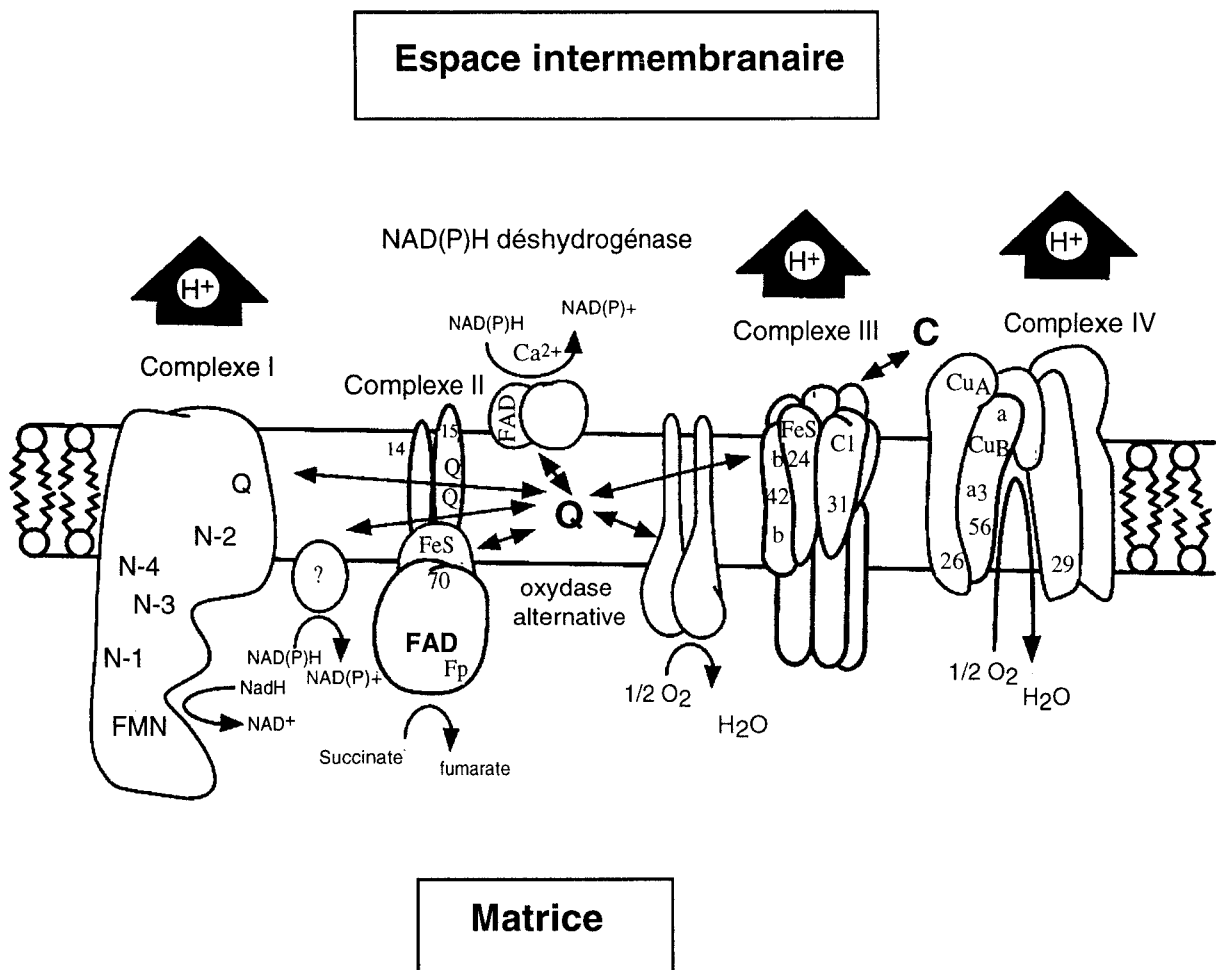


Figure 5: Chaîne de transfert des électrons dans la membrane interne des mitochondries de plantes.
d'après Siedow et Umbach, 1995, *Plant Cell*, 7, 821-831

Complexe I: NADH: ubiquinone oxydo-réductase

Complexe II: succinate: ubiquinone oxydo-réductase

Complexe III: ubiquinone: cytochrome *c* oxydo-réductase

Complexe IV: cytochrome *c* oxydase

C: cytochrome *c* (seule protéine de la chaîne de transport des électrons n'étant pas localisée dans la membrane interne)

FMN: Flavine Mono-Nucléotide (co-enzyme de déshydrogénase)

FAD: Flavine-Adénine-Dinucléotide (co-enzyme de déshydrogénase)

N-1 à N-4: Sous unités de la NADH déshydrogénase codées par les gènes *nad 1* à *nad 4*

Fp: Flavoprotéine, enzyme effectuant les réactions d'oxydo-réductions

Q: pool d'ubiquinones ou co-enzyme Q, transporteur d'électrons, mobiles et solubles dans la bicouche lipidique de la membrane interne

Les flèches en gras indiquent les complexes au niveau desquels existe un transfert de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire.

tricarboxyliques) et la phosphorylation oxydative. La glycolyse a lieu dans le cytoplasme et permet la dégradation du glucose en pyruvate. Ce dernier peut alors pénétrer dans la mitochondrie, où il est transformé en acétyl-coenzyme A. L'acétyl-coenzyme A entre dans le cycle de Krebs qui se déroule dans la mitochondrie. Le cycle de Krebs est situé à un carrefour des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il permet l'oxydation complète du glucose en CO_2 et H_2O . Au cours des réactions, le coenzyme NAD^+ est réduit en NADH. Afin que cette molécule puisse de nouveau être oxydée pour resservir dans d'autres réactions d'oxydoréduction, le coenzyme entre dans le processus de phosphorylation oxydative qui a lieu au niveau de la membrane interne des mitochondries (fig. 5). Le NADH est oxydé par la NADH déshydrogénase du complexe I mitochondrial. Le succinate, formé dans le cycle de Krebs, est oxydé par la succinate déshydrogénase du complexe II mitochondrial. Les deux électrons libérés dans le complexe I et II sont transférés au niveau du pool d'ubiquinones qui est lui-même alors réduit en ubiquinol. Cette réaction permet le transfert des électrons vers la cytochrome *c* réductase (bc1) du complexe III mitochondrial. A ce stade, les électrons sont alors transférés, via le cytochrome *c*, à la cytochrome *c* oxydase du complexe IV mitochondrial. Cette dernière réaction cède un électron à l'oxygène permettant, par la suite, la formation d'une molécule d'eau. Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons est couplé à des pompes à protons qui entraînent le passage de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Ce gradient de protons est utilisé par l'ATPase membranaire pour catalyser la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i . Comme on le verra au §1.2.3.2, certaines sous-unités composant les différentes enzymes utilisées dans les réactions de phosphorylation-oxydatives sont codées par le génome mitochondrial. On comprendra que des modifications au niveau de la séquence de ces gènes, de leur transcription, de leur traduction ou de processus postranscriptionnels peuvent avoir des répercussions sur la phosphorylation oxydative et donc des répercussions au niveau cellulaire et sur l'organisme entier.

1.2.3. Le génome mitochondrial

1.2.3.1. Taille et structure

Par rapport au génome originel du procaryote endosymbiote, de nombreuses restructurations se sont effectuées par un transfert massif de séquences vers le noyau qui contrôle maintenant une grande partie de la biogenèse des mitochondries (Leblanc *et al.*, 1997). Kurland (1992) suggèrent que la capacité du génome nucléaire à intégrer des gènes mitochondriaux serait un des moteurs qui a permis le succès de l'endosymbiose de la cellule procaryote ayant donné naissance aux mitochondries.

Les mitochondries synthétisent leur ADN à leur propre rythme, indépendamment de la phase S du noyau (André, 1994). Des études moléculaires portant sur les génomes mitochondriaux d'organismes aussi différents que les animaux, les champignons, les levures et les végétaux supérieurs, permettent de constater qu'ils présentent des caractéristiques très différentes :

- Chez les animaux, le génome mitochondrial est petit (14 kb à 42 kb), circulaire. Les gènes sont contigus, ou présentent des régions de recouvrements, et ne présentent pas d'introns (Wolstenholme, 1992). On constate un fort taux de substitution mais pas d'événements de recombinaison. L'arrangement des gènes est très conservé.

- Chez les champignons, l'ADNmt serait circulaire, d'une taille de 17 kb à 180 kb suivant l'organisme étudié. Il comporte des introns et des séquences non codantes.

- Chez la levure, en plus des régions non codantes, des régions riches en AT ont été détectées. Il existe également des petits éléments mobiles, riches en TGC, qui pourraient constituer une cible pour les événements de recombinaisons, à la suite desquels on constate un réarrangement des gènes. Il existe aussi des molécules présentes à l'état subgénomique. La caractéristique majeure des levures réside dans le fait qu'elles sont capables de se développer, même si une mutation affecte la respiration, en utilisant la fermentation qui leur permet de synthétiser quand même de l'ATP. De ce fait des mutations du génome mitochondrial qui seraient létales pour d'autres organismes, ne le sont pas chez les levures. Les levures ont ainsi permis de grands progrès dans l'étude du fonctionnement et du rôle de la mitochondrie.

- Chez les végétaux supérieurs, la structure de l'ADNmt est très complexe. La taille du génome varie de 208 kb (*Brassica hirta*) à 2400 kb (*Cucumis melo*). L'ADNmt des plantes contient de nombreuses séquences répétées, petites ou longues, directes ou inversées. Les séquences répétées longues donnent lieu à des événements de recombinaison qui s'effectuent à une fréquence élevée. Les séquences répétées courtes recombinent en réponse à des stress (Small *et al.*, 1989). Ces événements de recombinaison induisent une grande variabilité dans l'arrangement primaire des gènes mitochondriaux.

La totalité de l'information génétique peut être représentée sous forme d'une carte circulaire qui suggère l'existence de molécules circulaires portant la totalité de l'information génétique et appelées cercles maîtres (Leblanc *et al.*, 1997). Toutefois, les études de microscopie électronique et d'analyses électrophorétiques n'ont pas permis jusqu'à présent d'apporter des preuves quant à l'existence réelle de ces molécules circulaires (Bonen et Brown, 1993).

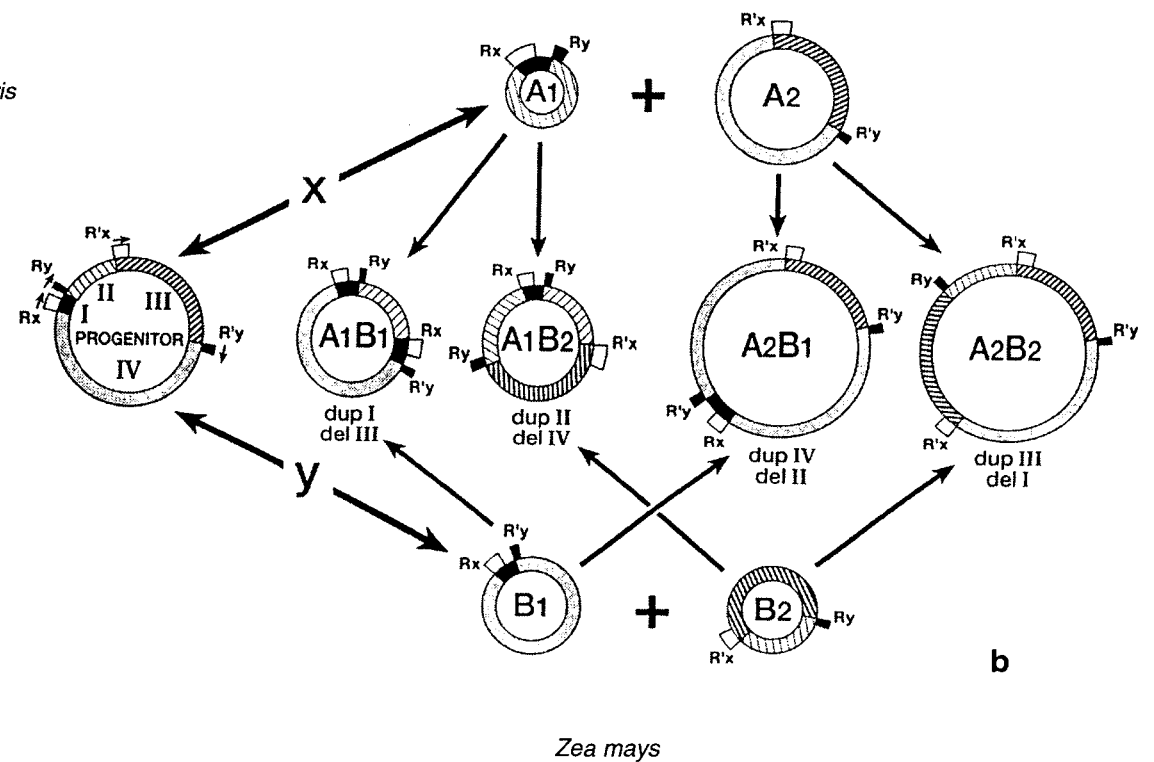
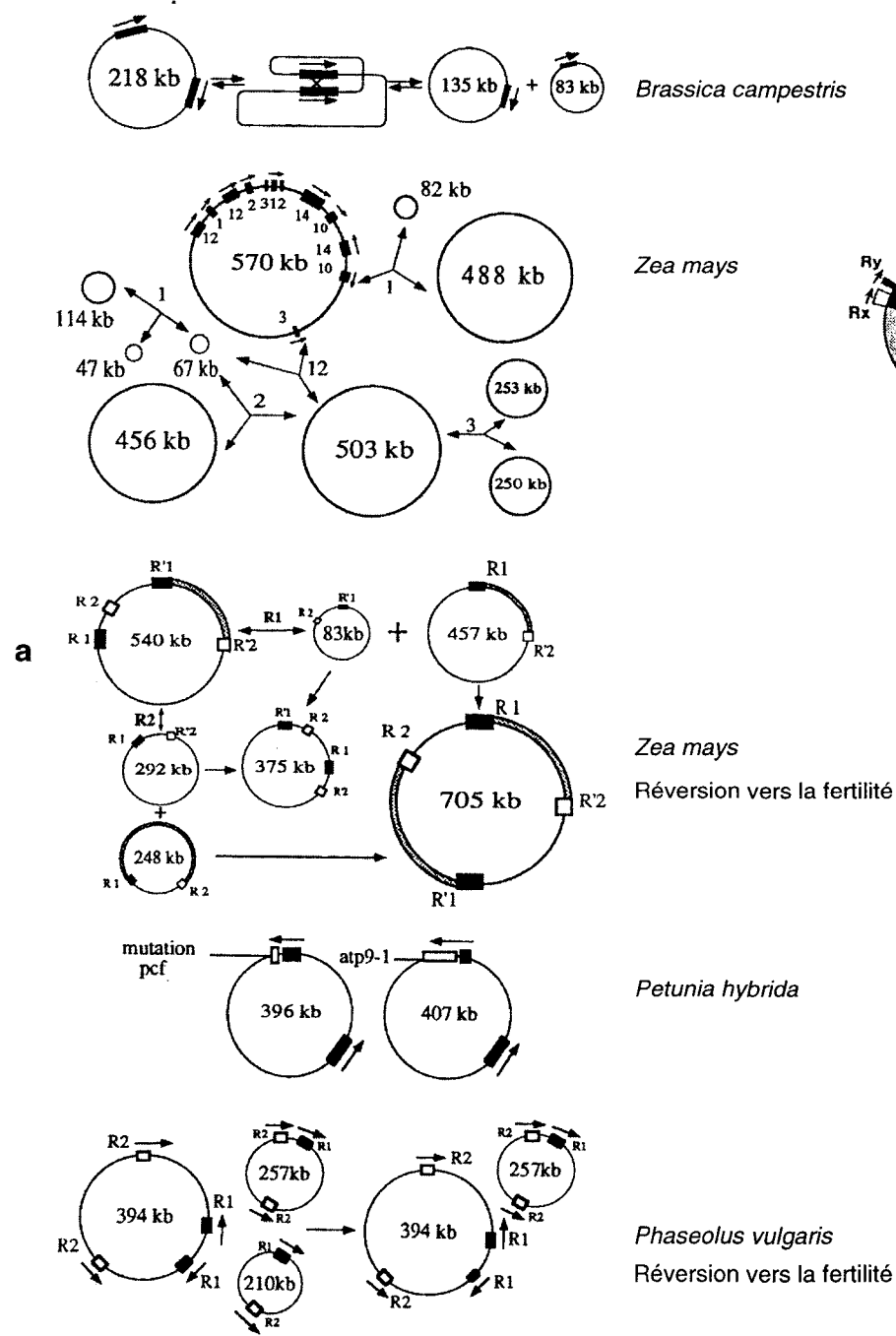


Figure 6 a, b: Exemples de diversités structurales observées dans les génomes mitochondriaux de plantes.

a d'après Mackenzie et al., 1994, *Plant Physiol.* 105: 775-780
b d'après Fauron et al., 1995, *Plant Sci.* 112: 11-32

Par le jeu de multiples recombinaisons homologues entre les séquences répétées, des cercles subgénomiques en équilibre dynamique avec le cercle maître seraient créés (fig. 6a, 6b). Les recombinaisons entre deux séquences répétées inversées génèrent deux cercles isomériques dans lesquels seule la région comprise entre ces deux séquences change d'orientation. Les recombinaisons entre deux séquences répétées directes génèrent deux cercles subgénomiques, contenant chacun une seule copie de la séquence répétée. On comprend que l'association dans le même génome de plusieurs séquences répétées courtes, longues, directes et inversées puisse engendrer une population très complexe de molécules subgénomiques (Fauron *et al.*, 1995). *Brassica hirta* (Palmer, 1988) constitue le seul exemple étudié dans lequel le génome mitochondrial ne serait constitué que d'un seul cercle d'ADNmt. L'existence de ces cercles subgénomiques n'est donc apparemment pas une nécessité pour le génome mitochondrial des plantes.

Certains cercles subgénomiques, appelés sublimons, sont présents en quantités très faibles. Small *et al.* (1987) ont émis l'hypothèse que, dans certaines conditions, ces sublimons pourraient entraîner une réorganisation du génome mitochondrial qui pourrait conduire à l'évolution de différents types cytoplasmiques. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de l'apparition des cytoplasmes inducteurs de smc. D'autre part, chez les Angiospermes, les recombinaisons mitochondriales contribueraient à éliminer les mutations délétères et permettraient une conservation générale de la séquence des gènes. Ce processus entraînerait cependant l'incorporation progressive de séquences non codantes et étrangères (Leblanc *et al.*, 1997). Si le génome mitochondrial consiste en une collection de molécules subgénomiques, il doit exister un mécanisme permettant aux cellules filles de recevoir le génome mitochondrial sans perte d'information (Bonen et Brown, 1993).

Le génome mitochondrial des plantes contenant de grandes régions intergéniques, on pourrait penser que les recombinaisons se produisent au sein de ces régions. Pourtant lorsqu'on compare, entre espèces différentes, les séquences des gènes codant pour une même protéine, on constate que les recombinaisons touchent des secteurs très proches des régions codantes et même parfois les parties codantes. En conséquence, une même protéine peut présenter, d'une espèce à l'autre, des différences au niveau de la séquence peptidique ou de sa longueur (Bonen et Brown, 1993). Contrairement aux gènes mitochondriaux des animaux, les gènes mitochondriaux de plantes peuvent contenir des introns qui sont pour la plupart analogues aux introns de type II (*nad 5* de l'oenothère, Wissinger, 1991), c'est-à-dire auto-épissables. L'épissage en trans a également été décrit (messager *nad 5* de l'oenothère, Knoop *et al.*, 1991). Les séquences des gènes mitochondriaux de plantes sont très conservées car le taux de substitution est faible. Les plantes ne présentent pas de variabilité intra-spécifique, ce

qui permet l'utilisation des analyses RFLP pour détecter l'existence éventuelle de variabilité interspécifique (Newton, 1988). En effet, les fréquentes recombinaisons peuvent engendrer des modifications dans l'arrangement primaire des gènes, les uns par rapport aux autres même lorsque des espèces apparentées sont comparées.

Chez les Fabacées, il est très surprenant de constater que le gène *coxII*, codant une des sous-unités de la cytochrome *c* oxydase, se trouve soit dans le génome mitochondrial (pois) soit dans le génome nucléaire (*Vigna sinensis* L., *Vigna radiata* L.) soit dans les deux génomes (soja), dans ce dernier cas seule la copie contenue dans le noyau est active (Brennicke *et al.*, 1993). Cela pourrait s'expliquer par un processus de transfert de certains gènes mitochondriaux vers le noyau par l'intermédiaire d'ARNm édités. La présence de gènes chloroplastiques (Stern et Lonsdale, 1982) ou nucléaires (Schuster et Brennicke, 1987) dans les mitochondries, de gènes mitochondriaux dans le noyau, et de certains gènes dans les trois compartiments suggère que des échanges d'informations génétiques existent entre les différents compartiments cellulaires (Whisson et Scott, 1985). La plupart du temps, les séquences nucléaires et chloroplastiques détectées sont non fonctionnelles dans la mitochondrie, mais des gènes codant pour des ARNt fonctionnels ont été détectés dans les mitochondries (Joyce et Gray, 1989 ; Maréchal-Drouard *et al.*, 1990). On pense que c'est la nature hautement recombinaisonnable de l'ADNmt qui lui permet d'intégrer des séquences étrangères.

Morèle-Le Paven *et al.* (1992) ont reporté de nombreux résultats montrant qu'un maintien prolongé d'explants en culture *in vitro* ainsi que les fusions de protoplastes (Belliard *et al.*, 1979, Shirzadegan *et al.*, 1991) peuvent induire des variations dans les profils de restriction de l'ADNmt. Dans de tels cas, certaines différences observées peuvent être assimilées à des modifications dans la répartition stœchiométrique de formes subgénomiques dont certaines étaient présentes à l'état de sublimons. Ces dernières voient leur représentation relative amplifiée et deviennent donc facilement détectables, alors qu'elles ne l'étaient pas dans l'équilibre dynamique précédent (Small *et al.*, 1989).

Enfin, les mitochondries végétales peuvent comporter, dans certains cas, des plasmides linéaires ou circulaires ainsi que de l'ARN double brin (Pring et Lonsdale, 1985). Enfin, on a détecté des séquences très homologues à des séquences d'ADN chloroplastique chez de nombreuses espèces (Lonsdale *et al.*, 1983).

Gène	At	Mp	Pa	Hs	Cr
Complexe I					
nad1	+	+	+	+	+
nad2	+	+	+	+	+
nad3	+	+	+	+	-
nad4	+	+	+	+	+
nad4L	+	+	+	+	-
nad5	+	+	+	+	+
nad6	+	+	+	+	+
nad7	+	Ψ	-	-	-
nad9	+	+	-	-	-
Complexe II					
sdhB	-	-	-	-	-
sdhC	-	+	-	-	-
sdhD	-	+	-	-	-
Complexe III					
cob	+	+	+	+	+
Complexe IV					
coxI	+	+	+	+	+
coxII	+	+	+	+	-
coxIII	+	+	+	+	-
Complexe V					
atp1	+	+	-	-	-
atp6	+	+	+	+	-
atp8	-	-	+	+	-
atp9	+	+	+	-	-

Gène	At	Mp	Pa	Hs	Cr
Protéines du ribosome					
rpl2	+	+	-	-	-
rpl5	+	+	-	-	-
rpl6	-	+	-	-	-
rpl16	+	+	-	-	-
rps1	-	+	-	-	-
rps2	-	+	-	-	-
rps3	+	+	-	-	-
rps4	+	+	-	-	-
rps7	+	+	-	-	-
rps8	-	+	-	-	-
rps10	-	+	-	-	-
rps11	-	+	-	-	-
rps12	+	+	-	-	-
rps13	-	+	-	-	-
rps14	Ψ	+	-	-	-
rps19	Ψ	+	-	-	-
ARN ribosomiques					
rrn5	+	+	-	-	-
rrn18	+	+	+	+	+
rrn26	+	+	+	+	+
ARNt	22	29	27	22	3
orf de fonction inconnue					
orfx	+	+	-	-	-
orfb	+	+	-	-	-
orf25	+	+	-	-	-

Tableau 1: Distribution des gènes mitochondriaux dans différents organismes

d'après Unseld et al. . Nature Genet..1997, 15, 57-61

At: *Arabidopsis thaliana*, Mp: *Marchantia polymorpha*, Pa: *Podospira anserina*,

Hs: *Homo sapiens*, Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*

+: séquence présente et exprimée dans la mitochondrie,

-: séquence absente

Ψ: pseudogène

1.2.3.2. Gènes codés par le génome mitochondrial

De manière générale, le génome mitochondrial des plantes code un plus grand nombre de protéines que celui des animaux (tableau 1). En fonction de l'espèce considérée, on constate que certaines protéines peuvent être codées dans le noyau ou dans la mitochondrie. Par ailleurs, chez les végétaux, certaines séquences, d'origine nucléaire ou chloroplastique, sont détectables seulement dans certains génomes mitochondriaux. Le séquençage du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* a permis l'identification de 57 gènes répartis sur environ 367 kb (Unsold *et al.*, 1997). Comme nous l'avons signalé, les phosphorylations oxydatives se déroulent dans la mitochondrie et le génome mitochondrial code certaines sous-unités de 4 des 5 complexes enzymatiques participant à ces réactions. Le complexe I contient la NADH déshydrogénase dont certaines sous-unités sont codées dans la mitochondrie par les gènes *nad*: *nad 1*, *nad 2*, *nad 3*, *nad 4*, *nad 4L*, *nad 5*, *nad 6*, *nad 7* et *nad 9*. Le complexe III contient l'apocytochrome *b* qui est une ubiquinol-cytochrome *c* oxydo-réductase codée par le gène *cob*. Le génome mitochondrial contient également les gènes *coxI*, *coxII*, *coxIII*, codant les trois sous-unités les plus grandes de la cytochrome *c* oxydase appartenant au complexe IV. Enfin, le génome mitochondrial code trois des sous-unités de l'ATPase membranaire que certains auteurs considèrent comme le complexe V permettant la synthèse d'ATP grâce à la force motrice du gradient de protons : *atpI* (ou *atpA*), codant pour une sous-unité appartenant à la région F_1 de l'ATPase, *atp6* et *atp9* qui codent deux sous-unités de la région F_0 de l'ATPase.

En plus des gènes mitochondriaux codant pour des sous-unités enzymatiques intervenant dans les réactions de phosphorylation oxydative, le génome mitochondrial code également certains éléments lui permettant de réaliser des traductions mitochondriales: les gènes *rrn18* et *rrn26*, qui codent respectivement les ARN ribosomiques, ARNr, de la petite et de la grande sous-unité du ribosome, et le gène *rrn5*. Ces gènes ressemblent, dans leur structure primaire et secondaire, aux gènes des ARN ribosomiques bactériens et chloroplastiques (Newton, 1988). Dans le génome mitochondrial d'*A. thaliana*, on trouve également les gènes *rpl2*, *rpl5*, *rpl16* codant pour les protéines contenues dans les grandes sous-unités du ribosome, les gènes *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps12* codant pour les protéines contenues dans les petites sous-unités ainsi que deux pseudogènes correspondant aux séquences des gènes *rps14* et *rps19*. On trouve enfin 22 gènes codant pour les ARN de transfert, ARNt, servant à la traduction mitochondriale. Chez *A. thaliana*, deux gènes, apparemment fonctionnels, codant pour les ARNt^{Asp} et ARNt^{Ser} ont été identifiés. Les ARNt, nécessaires pour la traduction et non codés par le génome mitochondrial, sont codés par le

génomique nucléaire et importés, du cytoplasme, dans la mitochondrie (Siedow et Umbach, 1995). Les gènes *rps* et *rpl* sont groupés en opéron (Leblanc *et al.*, 1997).

En plus de tous ces gènes dont les produits d'expression possèdent des actions connues, les plantes possèdent d'autres séquences codant pour des protéines dont la fonction n'a pas encore été déterminée, parmi ces ORF (Open Reading Frame) figurent l'*orfB* et l'*orf25* retrouvés dans la plupart des génomes mitochondriaux végétaux supérieurs. Cependant, il a été établi récemment que l'*orfB* correspondrait au gène *atp8*, codé par le noyau dans les autres organismes végétaux (Gray *et al.*, 1998) mais codé par le génome mitochondrial chez les mammifères (Unsold *et al.*, 1997)

1.2.3.3.Expression du génome mitochondrial des plantes

La majeure partie des ARNm mitochondriaux observés correspondent aux ARN ribosomiques (Newton, 1988). Environ un tiers seulement du génome mitochondrial semble exprimé mais le niveau d'accumulation des ARNm ne reflète pas leur niveau de transcription. La stabilité des ARNm semble en effet jouer un rôle très important dans l'expression du génome mitochondrial des plantes.

La majorité des gènes sont exprimés sous forme de transcrits monocistroniques mais certains gènes contigus peuvent être cotranscrits, comme c'est le cas des gènes *rrn18* et *rrn5* (Maloney et Walbot, 1990) ainsi que des gènes *nad3* et *rps12* (Gualberto *et al.*, 1991). Certains gènes peuvent présenter plusieurs promoteurs (gène *atp9* du maïs, Tracy et Stern, 1995), l'expression de ces gènes donnant alors naissance à plusieurs transcrits de tailles différentes. Un même gène peut enfin être présent en plusieurs copies dans le même génome mitochondrial, ces copies multiples donnant naissance à des transcrits présentant des régions 5' et 3' différentes qui peuvent à leur tour subir des événements de maturation différents. On comprend donc que les profils d'expression du génome mitochondrial soient très complexes.

De manière générale, on observe que la taille des ARNm est supérieure à la taille de la séquence codante. En effet, les ARNm mitochondriaux de plantes présentent, dans la majorité des cas, des régions 5' et 3' UTR (UnTranslated Region) pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centaines de nucléotides de long.

Dans les promoteurs des gènes mitochondriaux, la séquence conservée CRTA, où R représente une base purique, a été retrouvée chez les Monocotylédones et les Dicotylédones (Rapp *et al.*, 1993), qui présentent par ailleurs d'autres motifs conservés différents. Des promoteurs ne possédant pas cette séquence ont toutefois été observés. Il est donc possible qu'il existe dans la mitochondrie différentes ARN polymérases et différents facteurs de

transcription capables de reconnaître ces différentes régions. Cette séquence consensus est également différente de celle des levures, laissant penser que les initiations de transcription sont différentes chez les Monocotylédones, Dicotylédones et les levures. L'activité transcriptionnelle serait en partie régulée par les régions promotrices des gènes présentant une plus ou moins grande affinité pour le complexe d'initiation de transcription (Binder *et al.*, 1996).

Comme le séquençage du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* (Unsold *et al.*, 1997) n'a pas mis en évidence l'existence de gènes mitochondriaux codant pour une ARN polymérase, ni pour des facteurs de transcription, il est vraisemblable que ces éléments sont codés par le génome nucléaire. Cependant, un ADNc codant potentiellement une sous-unité d'ARN polymérase et possédant de fortes homologies avec l'ARN polymérase mitochondriale de la levure et celle des bactériophages, a été cloné chez *Chenopodium album* (Weihe *et al.*, 1997). L'extrémité N-terminale de cette sous-unité putative présente des ressemblances avec une séquence signal potentielle pour la mitochondrie. La comparaison des séquences des protéines montre que le polypeptide codé par le gène identifié chez *C. album*, conserverait tous les acides aminés essentiels pour l'action catalytique de la sous-unité. Toutefois, il semble manquer dans la région C-terminale, des séquences impliquées dans des sites catalytiques non essentiels.

Les ARNm mitochondriaux ne possèdent pas de coiffe en 5' ni de queue poly A en 3'. Par contre, on observe souvent l'établissement d'une structure secondaire en boucle au niveau de séquences répétées inversées en 3' des transcrits. Cette structure pourrait jouer un rôle dans la stabilisation des transcrits contre l'action des nucléases (Liu *et al.*, 1992), et dans la maturation des ARNm (Macfarlane *et al.*, 1990). Deux cas ont été décrits dans lesquels des régions différentes en 3' d'un gène (*cob* ou *orf138*) influencent la stabilité du messenger. A ces régions différentes correspondent l'existence ou non de structures secondaires en 3' impliquées dans la stabilité du messenger. Chez le riz, Kaleikau *et al.* (1992) ont constaté la présence de deux gènes *cob* présentant des séquences différentes en 3' de la séquence codante. L'analyse de l'expression de ces deux gènes a montré qu'ils sont tous deux transcrits mais que seul l'ARNm pouvant adopter une structure secondaire en boucle dans sa région 3' est accumulé. Les régions 3' des messagers du gène *orf138*, responsables de la smc-Ogura du colza, ont été impliquées dans la maturation des extrémités 3' de ces messagers et de leur stabilités relatives (Bellaoui *et al.*, 1997). Ces résultats confirment que ces structures jouent un rôle dans la maturation et dans la stabilité des messagers correspondants.

Lorsqu'une électrophorèse bidimensionnelle de protéines mitochondriales, issues de synthèse *in organello* est réalisée, de 30 à 50 spots différents peuvent être identifiés. Certains

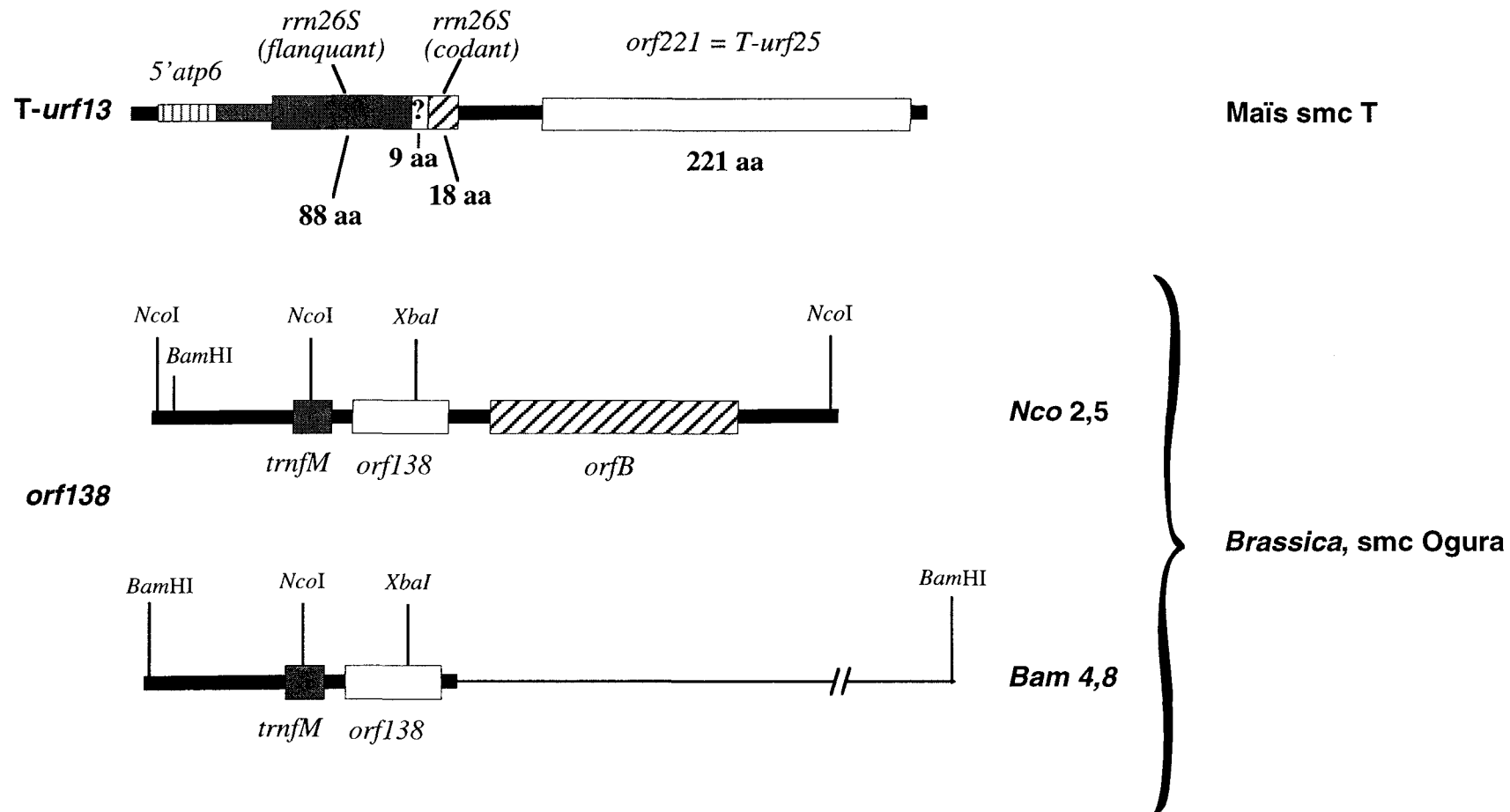


Figure 7: Représentation schématique des loci impliqués dans le contrôle de la smc-T du maïs et de la smc-Ogura du colza. Les boîtes représentent les séquences codantes et les traits représentent les espaces intergéniques. L'échelle n'est pas respectée. Les homologues existant avec des séquences codant pour des protéines de fonction connues sont signalées.

points correspondraient à des polypeptides identiques ayant subi des modifications post-traductionnelles différentes. Le génome mitochondrial coderait environ 25 protéines différentes (Unsold *et al.*, 1997). Il faut noter que dans les mitochondries de plantes, c'est le code génétique universel qui est utilisé.

Les modifications post-transcriptionnelles jouent un rôle très important dans le contrôle de l'expression du génome mitochondrial. L'édition constitue un de ces processus. Elle se manifeste par un mécanisme de désamination remplaçant dans les transcrits primaires la cytidine par l'uridine. L'édition affecte de 3 à 15% des codons au sein d'un transcrit codant une protéine (Hanson *et al.*, 1996). La comparaison des séquences en acides aminés des protéines et la séquence déduite de celle des gènes montre que, dans la plupart des cas, cette édition entraîne des modifications qui ne sont pas silencieuses comme dans le cas du gène *atp9* (Graves *et al.*, 1990). Chez le blé, le codon AUG d'initiation de traduction du gène *nad1* est généré par l'édition (Bonen, 1991) qui peut également générer des codons stop (Binder *et al.*, 1996). Il semble que des messagers édités ou non soient capables d'accéder au ribosomes (Gualberto *et al.*, 1991). La synthèse de protéines à partir d'ARNm non édités est possible, mais il est vraisemblable que les polypeptides produits soient non fonctionnels. Ils seraient d'autre part rapidement dégradés (Binder *et al.*, 1996).

Enfin, on constate que le nombre de copies d'un gène et de son transcrit varie en fonction du tissu et du stade de développement de la plante étudiée. La régulation de l'expression du génome mitochondrial se fait donc à l'échelle de la plante entière.

1.3.Exemples de SMC

1.3.1.Maïs

Chez le maïs, trois types différents de smc ont été différenciés en fonction des gènes nucléaires qui les restaurent. Chaque smc est engendrée par un cytoplasme particulier : cytoplasmes T, S et C.

- smc-T du maïs : Cette smc a été très étudiée en raison de l'utilisation très importante qui en a été faite dans les années 70 et en raison de la sensibilité que cette smc engendre vis-à-vis des toxines de deux pathogènes fongiques, *Bipolaris maydis* race T et *Phylostica maydis*. Dans les années 70, une perte de l'ordre du milliard de dollars a été subie par les agriculteurs américains qui cultivaient alors essentiellement des maïs porteurs du cytoplasme T (les maïs fertiles qui ne portent pas ce cytoplasme sont très faiblement atteints par ces deux pathogènes). Les premiers signes cytologiques de la smc observables sont la vacuolisation et

la dégénérescence des cellules du tapis juste après la méiose. De nombreux résultats ont permis d'établir que le gène *T-urf13* est responsable de la smc et de la sensibilité aux toxines des deux pathogènes, ainsi qu'à un herbicide, le méthomyl (Dewey *et al.*, 1987, Wise *et al.*, 1987). Le gène *T-urf13* est un gène chimérique, sans doute créé par recombinaisons, qui associe de 5' vers 3' une région semblable au gène *atp6*, la région 3' flanquante du gène *rrn26*, une séquence non identifiée et une partie de la région codante du gène *rrn26* (fig. 7). Il code une protéine de 13 kDa, URF13, qui est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie (Dewey *et al.*, 1987) qu'elle traverse trois fois. Son extrémité C-terminale se trouve dans la matrice (Korth *et al.*, 1991), l'extrémité N-terminale dans l'espace inter-membranaire (Levings et Siedow, 1992). Elle peut exister sous forme de monomères, dimères, trimères ou être oligomérique (Levings, 1993). La sensibilité engendrée par URF13 aux toxines des deux pathogènes serait liée à la capacité de cette protéine à induire la formation de pores dans la membrane interne de la mitochondrie en présence de la toxine (Levings, 1993). Flavell (1974) a supposé l'existence d'une substance inconnue (facteur X), synthétisée spécifiquement dans les anthères qui pourrait interagir avec la protéine URF13 en perméabilisant la membrane interne des mitochondries. Ce processus engendrerait un dysfonctionnement des mitochondries et une mort consécutive des cellules aboutissant à un arrêt dans le développement du pollen. L'interaction entre URF13 et le facteur X serait comparable à l'interaction entre URF13 et les toxines fongiques. La spécificité du facteur X pourrait expliquer pourquoi les anthères sont les seuls organes très affectés dans cette smc alors que la protéine URF13 est synthétisée dans la plante entière. Des cultures de cals de maïs smc-*T-urf13* ont été réalisées dans des milieux contenant ou ne contenant pas les toxines fongiques. Normalement, les cals smc-*T-urf13* sont sensibles à ces toxines et incapables de survivre dans un milieu les contenant. En présence de ces toxines, des cals ont permis de régénérer des plantes mâle fertiles insensibles aux toxines. En absence de toxine, des cals révertants ont permis également de régénérer des plantes mâle fertiles et insensibles aux toxines. Une étude des plantes mâle fertiles ainsi régénérées a permis de mettre en évidence un lien entre le retour à la fertilité, l'insensibilité aux toxines fongiques et des réarrangements au niveau de la séquence du gène *T-urf13*. Ces résultats suggèrent que *T-urf13* confère un désavantage sélectif aux cals qui le portent, indépendamment de la sensibilité aux toxines et que *T-urf13* est responsable de la smc-T et de la sensibilité aux toxines fongiques (Levings, 1993). URF13 confère également une sensibilité aux toxines dans les mitochondries de levure (Glab *et al.*, 1993), dans les tabacs transgéniques (von Allmen *et al.*, 1991) ainsi que dans les cellules et les larves d'insectes (Korth et Levings, 1993). Des bactéries ont été transformées avec le gène *T-urf13* placé derrière un promoteur inductible fort ou derrière un promoteur inductible faible (*tac*) entraînant une expression faible de *T-urf13*. Dans le cas d'un

promoteur fort, les bactéries présentent une forte expression de T-*urf13* et meurent. Dans le cas du promoteur faible, l'accumulation des protéines URF13 est faible, un ralentissement de la croissance ainsi qu'une diminution de la viabilité sont observés. Il semble que l'effet d'URF13 sur la viabilité soit indépendant de la sensibilité aux toxines puisque des colonies mutantes, insensibles aux toxines, présente une viabilité affectée par URF13 (Levings, 1993).

Pour restaurer la fertilité des maïs portant le cytoplasme T, la présence simultanée de deux gènes nucléaires dominants de restauration, *Rf1* et *Rf2*, est nécessaire. Le gène *Rf1* entraîne une diminution de l'accumulation de la protéine URF13 de 80% (Kennel et Pring, 1989) par une altération de la maturation du transcrit (Kennel *et al.*, 1987). Il a été cloné et sa séquence présente une forte homologie avec des gènes de mammifères codant des aldéhyde déshydrogénases, ALDH, (Schnable et Wise, 1994, Cui *et al.*, 1996). Le gène *Rf1* pourrait avoir un rôle de détoxification de l'éthanol et de l'acétaldéhyde après une courte période de fermentation. L'ALDH n'aurait pas un rôle strictement limité à la restauration de la smc-T, mais pourrait y participer par sa fonction.

- smc-S du maïs : Elle est restaurée par un seul gène nucléaire dominant, *Rf3*, exerçant son action sur le gaméophyte (Kamps *et al.*, 1996). La région associée à l'apparition de la smc-S est exprimée dans les tissus gaméophytiques (microspores) et sporophytiques (épis immatures) mais son expression semble particulièrement importante et préjudiciable après la méiose. *Rf3* semble agir au niveau de ces deux catégories de tissus mais son effet est prédominant au niveau du développement des grains de pollen (Zabala *et al.*, 1997). Cette smc est caractérisée par la présence de deux épisomes S1 (6397 pb) et S2 (5453 pb), constitués d'ADN double brin contenant la même séquence répétée inversée de 208 pb ressemblant à une séquence de 186 pb du gène mitochondrial *coxI*. Cette séquence de 208 pb est également retrouvée dans une longue répétition, R, trouvée dans l'ADNmt circulaire des maïs portant le cytoplasme smc-S. Cette région R est une séquence chimérique, contenant deux ORF, *orf355* et *orf77*, qui serait le résultat d'une série complexe d'événements de recombinaison. La région R est capable de recombiner avec les épisomes S1 et S2. Un ARNm de 1,6 kb, correspondant à un des produits d'expression de la région R a été détecté. Ce transcrit n'est pas détecté chez des maïs révertants. *Rf3* semble agir sur l'abondance des transcrits majeurs correspondant à la région R, et en particulier sur l'ARNm de 1,6 kb (Kamps *et al.*, 1996), mais le mode d'action de *Rf3* semble très complexe.

- smc-C du maïs : Elle est restaurée par un ou deux gènes qui ont une action sporophytique. Levings et Dewey (1988) ont constaté la présence d'un gène *atp9* présentant une région 5' modifiée, entraînant la synthèse d'un transcrit *atp9* altéré chez les maïs mâle

stériles porteurs de ce cytoplasme. La région codante du gène *coxII* est également fusionnée avec la séquence codant pour la région N-terminale et la région 5' flanquante du gène *atp6*. Ces régions du gène *atp6* font également partie d'une autre ORF contenant la région 5' flanquante d'*atp9* et une région ressemblant à une séquence du génome chloroplastique. Une protéine de 17 kDa est spécifique de ce cytoplasme mais le gène de restauration *Rf4* n'a apparemment pas d'effet sur sa présence (Forde *et al.*, 1978).

1.3.2. *Nicotiana*

De nombreuses lignées de tabacs mâle stériles ont été obtenues par le biais de rétrocroisements successifs entre des espèces sauvages de Nicotianées et du tabac cultivé (*Nicotiana tabacum*) utilisé comme parent mâle récurrent, aboutissant à l'apparition de smc alloplasmiques (Breiman et Galun, 1990, Bonnett *et al.*, 1991). Des tabacs mâle stériles ont également été régénérés à l'issue de fusion de protoplastes entre des *N. tabacum* var. Xanthi fertiles et des protoplastes de *N. tabacum* var. Techne présentant une smc (Belliard *et al.*, 1978). Les analyses effectuées sur les génomes mitochondriaux des cybrides mâle stériles ont montré que les génomes ne correspondaient pas à l'un ou l'autre des parents de fusion ni à l'addition des deux génomes mais qu'ils provenaient d'événements de recombinaisons entre ces deux génomes (Belliard *et al.*, 1979, Galun *et al.*, 1982). Dans une autre lignée alloplasmique de tabac mâle stérile, associant un noyau *Nicotiana tabacum* et un cytoplasme *Nicotiana bigelovii*, Bergman *et al.* (1994) ont détecté la présence d'un gène chimérique, *orf38/211*. Cet ORF code 38 premiers acides aminés puis 211 acides aminés identiques à la région C-terminale de la sous unité α de l'ATPase. L'*orf38/211* est associée au phénotype mâle stérile. Le transcrit de ce gène est édité au niveau de 7 sites différents entraînant des modifications dans la séquence des acides aminés qui se traduisent par une augmentation de l'homologie entre l'ORF38/220 et la région C-terminale de la sous-unité α de l'ATPase, correspondant au site actif de l'enzyme. Dans la protéine ORF38/220 la région correspondant au site de fixation de l'ADP sur l'ATPase est perdue. Bergman *et al.* ont supposé que l'édition permettrait une insertion des protéines ORF38/220 dans le complexe F1-ATPase. Cette association créerait des enzymes non fonctionnelles, en raison en partie de l'absence de fixation de l'ADP. Ces complexes entreraient en compétition avec les complexes fonctionnels et pourraient ainsi induire la smc.

1.3.3. *Brassica*

Dans la famille des Brassicacées, le premier cas de smc a été décrit par Ogura chez un radis japonais (1968). La smc Ogura a tout d'abord été transférée chez le chou puis dans des radis européens dans le cadre d'un programme de sélection de radis européens (Bonnet, 1977). Chez le radis mâle stérile, Ogura (1968) a montré une dégénérescence précoce des cellules du tapis qui pourrait être la cause de l'avortement des microspores.

La smc Ogura a été transférée à d'autres *Brassica* en raison de la stabilité du caractère mâle stérile qu'elle engendre, même dans des conditions climatiques particulières, alors que d'autres smc chez les *Brassica* montraient une instabilité dans des conditions de températures élevées. Des colzas mâle stériles ont été obtenus par croisements intergénériques avec des radis mâle stériles présentant la smc Ogura (Bannerot *et al.*, 1974) suivis de croisements récurrents par le parent mâle (colza). Les plantes obtenues étaient mâle stériles mais des problèmes de fertilité femelle, une faible production de nectar et une déficience chlorophyllienne à basse température se sont trouvés associés à cette smc (Bannerot *et al.*, 1977). Ces problèmes ont été identifiés comme résultant d'une mauvaise interaction entre les chloroplastes et les mitochondries de radis et les noyaux de colza. Pelletier *et al.* (1983) ont réussi à les résoudre en fusionnant des protoplastes de colza à cytoplasme Ogura, avec des protoplastes de colza fertile et en contre sélectionnant les déficiences des colzas mâle stériles initiaux. Cette technique a permis de régénérer des cybrides de colza mâle stériles présentant des chloroplastes et un noyau de colza ainsi que des mitochondries recombinaisonnées, avec des profils de restriction d'ADNmt variables, différents de ceux des deux parents. Tous les cybrides mâle stériles régénérés possédaient des fragments d'ADNmt caractéristiques des mitochondries de radis mâle stériles Ogura (Vedel *et al.*, 1987). La restauration de la fertilité des différents cybrides obtenus a permis de les classer en trois catégories différentes. Certains cybrides mâle stériles étaient restaurés par le même restaurateur que les radis mâle stériles Ogura. Un deuxième groupe de cybrides nécessitait plusieurs gènes de restauration dont un gène apparemment lié à la couleur des fleurs. Le troisième groupe semblait nécessiter les gènes de restauration des deux autres groupes.

Le premier groupe de cybrides porte la smc qui a été par la suite utilisée pour la production de semences hybrides et appelée smc Ogu-INRA. Il a été étudié sur le plan moléculaire. Bonhomme *et al.* (1991) ont corrélié la smc Ogu-INRA du colza à la présence d'un fragment *NcoI* de 2,5 kb présent chez un cybride stérile 13S mais absent chez un de ses descendants ayant réverté vers la fertilité (13F). Ce fragment, également présent chez le radis Ogura (Krishnasamy et Makaroff, 1993), contient le gène *trnfM* codant pour l'ARNt formyl-méthionine, une première phase ouverte de lecture, *orf138*, et une deuxième ORF de 158

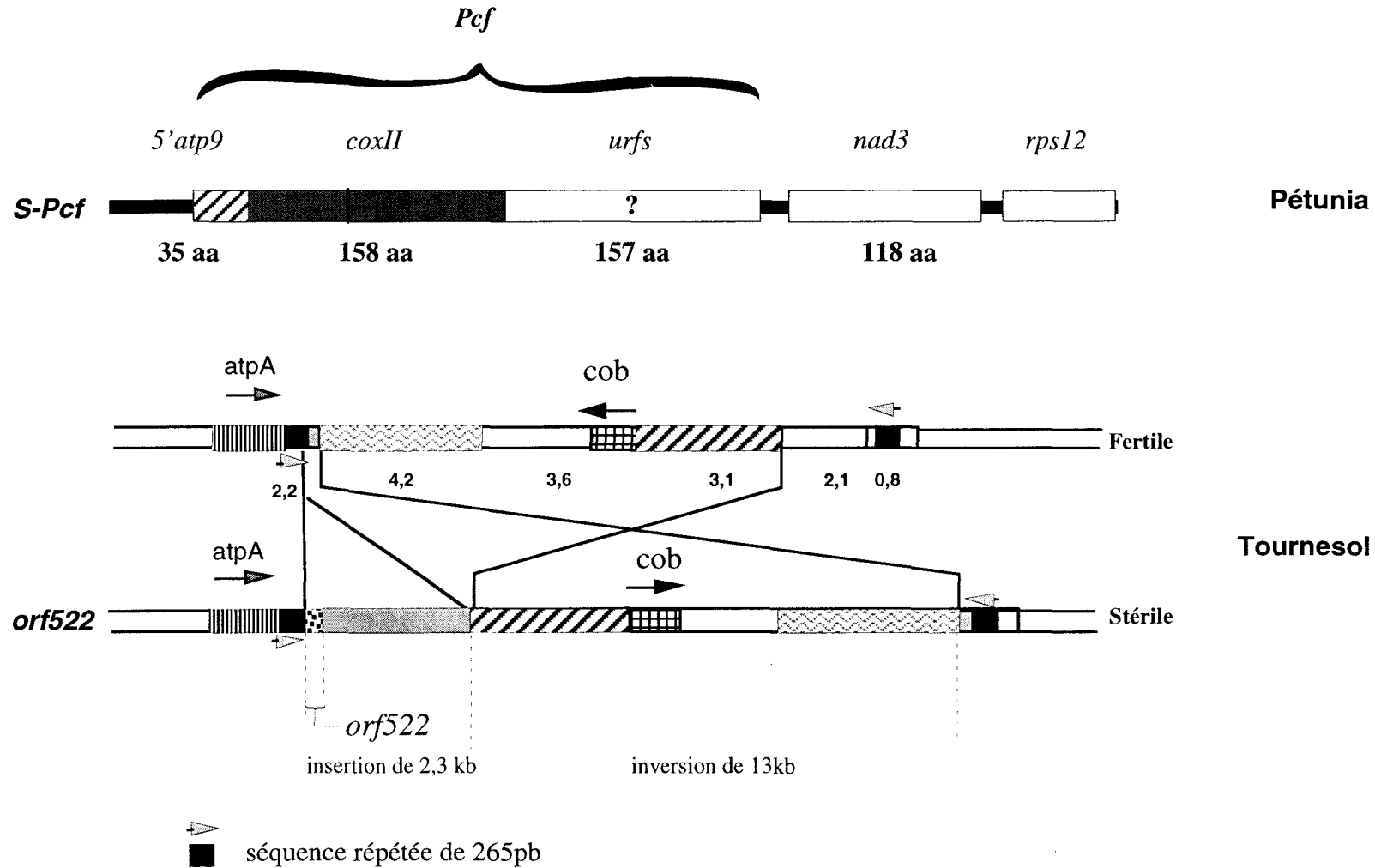


Figure 8: Représentation schématique des loci impliqués dans le contrôle de la *smc-Pcf* du pétunia et de la *smc-PET1* du tournesol. Les boîtes représentent les séquences codantes et les traits représentent les espaces intergéniques. L'échelle n'est pas respectée. Les homologies existant avec des séquences connues sont signalées.

codons qui correspond au gène *orfB* (Bonhomme *et al.*, 1992) (fig. 7). Le gène *orf138* code une protéine membranaire de 19 kDa détectée uniquement dans les plantes mâle stériles. Grelon *et al.* (1994) ont également mis en évidence dans un autre cybride, 18S, un fragment *Bam*HI de 4,8 kb contenant l'*orf138*. Le cybride 18S est instable et peut réverter comme 13S vers la fertilité (18F) en perdant le gène *orf138*. Tout comme pour le cybride 13S, 18S présente une forte accumulation du transcrit correspondant à l'*orf138*.

Bonnet (1975) a mis en évidence plusieurs variétés européennes de radis restaurateurs de la *smc* Ogura. Ces gènes de restauration ont été introgressés chez le colza (Heyn, 1976, Heyn, 1978). Le gène nucléaire dominant *Rfo* restaure la fertilité mâle mais une diminution de la fertilité femelle et une forte teneur en glucosinolate se sont trouvées associées à la restauration. Le problème de fertilité femelle engendré par le fragment contenant le gène *Rfo* a été résolu mais le problème de la forte teneur en glucosinolate demeure (Delourme *et al.*, 1995). Le gène de restauration *Rfo* agit spécifiquement, de façon dominante, dans certains organes de la fleur (dont les anthères), sur l'accumulation de la protéine ORF138 (Grelon *et al.*, 1994). Le mécanisme de cette restauration semble être post-traductionnel (Bellaoui, Grelon, Pelletier et Budar, en prep.).

1.3.4. *Petunia*

La *smc* du *Petunia* trouverait son origine dans des croisements interspécifiques entre des espèces sauvages et des espèces cultivées (Hanson et Condé, 1985). Les premières différences physiologiques observables entre les *Petunia* stériles et fertiles sont visibles au moment de la prophase I de la méiose. A ce stade, les cellules du tapis sont vacuolisées et les mitochondries ont des formes anormales (Flavell, 1974). Une analyse RFLP a mis en évidence de nombreuses différences au niveau de l'ADNmt entre les *Petunia* fertiles et les *Petunia* à cytoplasme mâle stérile. Les fusions de protoplastes réalisées par Izhar *et al.* (1983) entre des protoplastes de *Petunia* fertile et des protoplastes de *Petunia* stérile ont permis de mettre en évidence une séquence mitochondriale particulière, *S-pcf*, corrélée à l'apparition du phénotype mâle stérile (fig. 8). Au début de cette région se trouve le gène *pcf* (*Petunia* CMS-associated fused gene) (Young et Hanson, 1987). Ce gène associe dans la même phase ouverte de lecture la région 5' de la partie codante du gène *atp9*, des portions des deux exons du gène *coxII* (Pruitt et Hanson, 1989) et une séquence inconnue *urfS* (Young et Hanson, 1987). En aval de la séquence *pcf*, se trouvent les gènes *nad3* et *rps12*, cotranscrits avec *pcf* (Hanson *et al.*, 1989). Le gène *urfS* code une protéine de 25 kDa (Nivison et Hanson, 1989). Une comparaison entre la protéine de 25 kDa et la protéine de 43 kDa, correspondant au produit de traduction théorique du gène *S-pcf*, révèle qu'il existe une maturation post-

traductionnelle. Il existe dans cette protéine des régions potentiellement hydrophobes mais les expériences de fractionnements n'ont pas permis d'associer URFS strictement avec une des fractions membranaire ou soluble. La fertilité mâle est restaurée par un gène nucléaire de restauration, *Rf*, qui entraîne une diminution de l'abondance de l'un des transcrits de la séquence *S-pcf* (Pruitt et Hanson, 1991) ainsi que de la protéine de 25 kDa (Connett et Hanson, 1994). Cette diminution est variable suivant l'organe considéré (Young et Hanson, 1987). Ces résultats semblent indiquer un lien entre la protéine de 25 kDa et la smc du pétunia.

1.3.5. Haricot

Chez *Phaseolus vulgaris*, une smc spontanée (smc-Sprite) a été observée. D'autres smc ont été obtenues à l'issue de croisements interspécifiques à l'INRA de Versailles (Bannerot et Charbonier, 1987, Hervieu *et al.*, 1994). Toutes ces smc ont été associées à la présence d'un fragment spécifique d'ADNmt de 3 kb dénommé *pvs* (Chase et Ortega, 1992, Chase, 1994, Hervieu *et al.*, 1993). Des études histologiques ont montré que dans les lignées mâle stériles, le dépôt de callose est très réduit au niveau des microspores et que celles-ci restent associées en tétrade (Abad *et al.*, 1995).

La réversion vers la fertilité, provoquée par le gène de restauration *Fr*, a été associée à la perte d'un fragment d'ADNmt d'au moins 25 kb appartenant à une particule subgénomique contenant le fragment *pvs* (Janska et Mackenzie, 1993). Ce fragment contient deux phases ouvertes de lecture *orf98* et *orf239*. Le gène nucléaire *Fr2* restaure la fertilité en induisant une diminution de l'accumulation des transcrits spécifiquement détectés dans les plantes mâle stériles (Chase, 1994). Des anticorps dirigés contre la protéine ORF239 ont montré que cette protéine est localisée dans la paroi des cellules et que sa présence est limitée aux cellules des tissus reproducteurs (gamètes mâles et tissu reproducteur femelle) (Abad *et al.*, 1995). Ces observations différencient la smc du haricot des smc identifiées dans les autres espèces, chez lesquelles la protéine corrélée avec l'apparition du phénotype mâle stérile est retrouvée dans tous les tissus de la plante. D'autre part, l'action du gène de restauration *Fr* entraînant une restauration définitive, assimilable à une réversion n'a été décrite que chez le haricot et la féverole (Bond *et al.*, 1966)

1.3.6. Tournesol

Plusieurs types de smc ont été répertoriés chez le tournesol. La première smc, dénommée PET1, a été identifiée par Leclercq (1969) à la suite d'un croisement

interspécifique entre *Helianthus annuus* L. et *Helianthus petiolaris* L.. Cette smc est aujourd'hui utilisée pour la production commerciale d'hybrides.

Des études cytologiques ont montré que le développement des anthères, chez les tournesols stériles, est normal jusqu'au stade leptotène de la méiose que subissent les méiocytes. Au stade pachytène, des anomalies sont détectables, par microscopie électronique, dans les méiocytes. Pendant la méiose, les cellules du tapis montrent un développement anormal, et au stade tétrade elles ont complètement dégénéré (Smart *et al.*, 1994).

L'organisation de l'ADNmt des tournesols fertiles et mâle stériles diffère au niveau d'une région de 17 kb contenant les gènes mitochondriaux *atpA* et *cob* (fig.8). Des analyses, portant sur cette région, ont montré l'existence d'une inversion de 13 kb, entraînant un changement d'orientation du gène *cob*, ainsi qu'une insertion de 2.3 kb (Siculella et Palmer, 1988, Köhler *et al.*, 1991, Laver *et al.*, 1991). La présence d'une courte séquence répétée directe de 265 pb aurait permis ces remaniements. L'insertion de la séquence de 2.3 kb est à l'origine de la création d'une nouvelle phase ouverte de lecture, *orf522*, située en aval du gène *atpA*. La séquence du gène *orf522* présente des homologues avec la séquence de l'*orfB* pour les 57 premières paires de bases (Köhler *et al.*, 1991, Laver *et al.*, 1991). Chez les tournesols fertiles, il existe deux phases ouvertes de lecture en aval du gène *atpA*, *orf708* et *orf873*, qui ne sont pas transcrites. Dans le cytoplasme PET1, l'*orf708* est interrompue par l'insertion du fragment de 2.3 kb (Monéger *et al.*, 1994). Il faut noter que l'*orf522* a également été détecté chez des tournesols fertiles en très faible quantité (Monéger *et al.*, 1994). Cette séquence, qui existerait à l'état de sublimon chez les plantes fertiles, aurait pu être amplifiée à la suite des croisements interspécifiques. L'*orf522* est cotranscrite avec le gène *atpA* en un ARNm de 3 kb, détecté dans tous les organes des tournesols mâle stériles et donne naissance à une protéine de 15 kDa (Monéger *et al.*, 1994).

La smc-PET1 est restaurée par au moins deux gènes nucléaires, *Rf1* et *Rf2*, qui entraînent une diminution de la quantité d'ARNm correspondant à l'*orf522*, dans les fleurons. Celle-ci se traduit par une diminution de l'accumulation de la protéine de 15 kDa. Cette diminution n'est observée que dans les méiocytes des tournesols restaurés. L'effet des gènes de restauration est donc spécifique des méiocytes et des cellules du tapis, pendant les stades précoces de la méiose (Smart *et al.*, 1994). Des expériences de "run-on" ont montré que le taux de transcription de la séquence *atpA-orf522* reste identique dans les tournesols restaurés (Monéger *et al.*, 1994, Smart *et al.*, 1994). Ce résultat suggère que les gènes de restauration agissent en déstabilisant le messager *atpA-orf522*, entraînant une diminution de l'abondance de la protéine de 15 kDa. Ces résultats confirment le rôle de l'*orf522* et de la protéine de 15 kDa dans la smc PET1. La séquence *atpA* caractéristique des tournesols

fertiles est également présente dans le génome mitochondrial des tournesols mâle stériles PET1. Smart *et al.* (1994) ont montré que les accumulations du transcrit *atpA* et de la protéine ATPA sont identiques chez les tournesols stériles et fertiles, lorsque les premières manifestations de développement anormal apparaissent dans les tournesols stériles. Ce résultat suggère que la smc-PET1 n'est pas engendrée par une altération de l'expression du gène *atpA* (Smart *et al.*, 1994).

Spassova *et al.* (1994) ont étudié différentes lignées indépendantes de tournesols mâle stériles. Une de ces lignées, CMS3, s'est avérée présenter des caractéristiques différentes de la smc PET1. Parmi les sondes mitochondriales utilisées en RFLP, les sondes *atp6*, *atp9*, *atpA*, *nad1+5* et *coxIII* ont donné des profils différents de ceux obtenus pour le tournesol fertile et le tournesol stérile porteur du cytoplasme PET1. D'autre part, les sondes *orf522* et *orf873* ne donnent pas de signal d'hybridation chez les tournesols CMS3. Dans les mitochondries contenues dans le cytoplasme inducteur de la smc CMS3, les gènes *atpA* et *coxIII* sont très proches, à la différence des tournesols fertiles et mâle stériles PET1. Spassova *et al.* (1994) émettent l'hypothèse que cette configuration trouverait son origine dans des événements de recombinaison impliquant la séquence répétée directe de 265 pb, qui semble déjà impliquée dans les réarrangements associés à la smc PET1. Le cotranscrit *atpA-orf522*, ainsi que la protéine de 15 kDa, des tournesols PET1 sont absents par contre trois protéines mitochondriales nouvelles de 14, 18 et 38 kDa sont détectées (Spassova *et al.*, 1994). Le gène *coxIII* du tournesol CMS3 a été séquencé et montre une substitution de l'adénine à la position 2719 du gène *coxIII* en une cytosine. Cette substitution fait disparaître le codon stop du gène et induit une extension de la séquence codante. Les gènes *orfB* et *coxIII* sont cotranscrits, comme chez le tournesol fertile, mais à partir d'un messager de taille supérieure à celui présent chez le tournesol fertile. La smc CMS3 pourrait être due à une modification de l'expression de la séquence *coxIII-orfB* ou de la séquence du gène *atp6*. Pour l'instant, les phénomènes de restauration n'ont pas encore été étudiés. De ce fait, le choix en faveur de l'une de ces hypothèses n'est pas possible (Spassova *et al.*, 1994).

1.4.SMC: caractéristiques communes-

Hypothèses sur le mécanisme

Les études portant sur la compréhension des mécanismes aboutissant à l'apparition de la smc mettent en évidence le rôle fondamental de la mitochondrie dans le développement correct des tissus reproducteurs mâles.

La plupart des smc semble être provoquée par un accident survenant dans les étapes précoces de la microsporogénèse.

La réversion vers la fertilité, lorsqu'elle peut être observée, est généralement spontanée. Toutefois, chez le haricot et la féverole, elle peut être provoquée par un gène nucléaire, *Rf*. L'analyse moléculaire des plantes révertantes met en évidence des différences avec les plantes mâle stériles au niveau de la structure du génome mitochondrial ou de son expression. La réversion peut alors être associée à la perte de fragments spécifiques d'ADNmt des cytoplasmes inducteurs de stérilité ou à la modification de l'expression du génome mitochondrial. Les régions subissant ces modifications peuvent être considérées comme portant le déterminisme de la smc. Ces observations ont permis de mettre en évidence l'existence de fragments d'ADNmt, absents dans les plantes révertantes, correspondant à des gènes chimériques. Small *et al.* (1989) ont émis l'hypothèse que des événements de recombinaisons peu fréquents entre petites séquences répétées participent aux nouvelles organisations des génomes mitochondriaux trouvées dans les lignées mâle stériles. Ces événements ont pu donner lieu à la création de nouveaux gènes, que l'on peut qualifier de gènes chimériques puisqu'ils associent des séquences d'ADNmt préexistantes dans le génome au sein d'une phase ouverte de lecture (*T-urf13* dans les maïs présentant la smc-T, *pcf* chez le pétunia, *pvs* chez le haricot et *orf522* du tournesol porteur de la smc PET1). Il faut cependant noter que l'apparition de nouvelles séquences n'induit pas forcément l'apparition de la smc.

Les nouveaux gènes ainsi créés sont presque toujours cotranscrits avec des gènes indispensables, codant souvent pour des sous-unités de l'ATPase. Le profil d'expression en northern de ces gènes obligatoires peut être altéré par rapport au cytoplasme non inducteur de stérilité. La recherche d'une modification de l'expression de ces gènes obligatoires peut aider à détecter la région de l'ADNmt impliquée dans la smc, mais cette modification d'expression n'est pas nécessairement liée à l'apparition du phénotype mâle stérile (expression du gène *atpA* dans les tournesols mâle stériles porteur du cytoplasme PET1, Smart *et al.*, 1994).

Les gènes chimériques peuvent être traduits et donner naissance à des nouveaux polypeptides, souvent hydrophobes, qui peuvent être corrélés à l'apparition du phénotype mâle stérile. Ces polypeptides sont généralement détectés dans tous les organes de la plante et pourraient être localisés dans la membrane interne des mitochondries du fait de leur hydrophobicité. Certains de ces polypeptides ont d'ailleurs déjà été localisés dans la fraction membranaire.

La restauration de la fertilité est gouvernée par des gènes nucléaires, le plus souvent dominants. Elle s'accompagne d'une modification (diminution) de l'expression de la

séquence associée à la smc. Il faut noter que l'action des gènes de restauration peut être tissu-spécifique.

Aux vues des connaissances accumulées sur les différentes smc, des caractéristiques communes apparaissent. Toutefois, certaines smc présentent des caractéristiques très différentes des autres. On peut citer à titre d'exemple la smc de *Phaseolus vulgaris* L., chez laquelle le gène de restauration *Rf* entraîne une perte du déterminant de la smc au lieu d'entraîner une modification de son expression. La protéine ORF239, associée à cette sm, est localisée dans la callose et dans la paroi primaire des microspores ainsi que dans le tissu reproducteur femelle au lieu d'être localisée dans les mitochondries ou dans leur membrane interne et dans tous les organes de la plante (Abad *et al.*, 1995). D'autre part des tabacs transgéniques mâle stériles exprimant la protéine ORF239 sans séquence d'adressage vers la mitochondrie ont été obtenus (He *et al.*, 1996). La protéine ORF239 présente donc un effet toxique pour le développement des microspores, indépendamment de l'endroit où la séquence *orf239* est exprimée. La smc du haricot n'est donc pas directement liée à l'expression d'une séquence d'ADNmt dans la mitochondrie (Schnable et Wise, 1998).

Dans la plupart des smc étudiées, c'est souvent dans le tapis que les premières anomalies sont détectables, entraînant certainement par la suite un arrêt dans le développement correct du pollen. Ces anomalies se caractérisent par un développement anormal du tapis avant la méiose et/ou une dégénérescence anormale après la méiose (Palmer *et al.*, 1992). Elles sont généralement détectées au stade tétrade et juste après la formation des microspores (Horner et Palmer, 1995). Etant donnée l'importance du tapis pour la formation des grains de pollen, on comprend qu'une anomalie dans le développement des cellules du tapis puisse avoir une répercussion dramatique sur la fertilité mâle.

Ce qui reste surprenant dans l'étude de la smc, c'est que les anomalies phénotypiques ne soient observables qu'au niveau de l'anthère alors que généralement les gènes chimériques détectés et associés à la smc sont exprimés dans tous les organes de la plante. Toutefois, comme cela a été observé pour les maïs mâle stériles porteurs du cytoplasme T, on peut parfois observer une baisse de vigueur chez les plantes mâle stériles. D'autre part dans la smc-Sprite, l'expression de la protéine ORF239 est spécifique de certains tissus (Mackenzie *et al.*, 1994).

Un mécanisme interactionnel, basé sur la synthèse d'un composé spécifique dans les anthères, pourrait expliquer ce phénomène. C'est l'hypothèse de Flavell (1974) suggérant l'existence d'un facteur X, trouvé spécifiquement dans les anthères et à certains stades, qui interagirait avec les protéines caractéristiques de la smc pour induire des dysfonctionnements dans la mitochondrie. Chez le maïs, URF13 associé aux toxines fongiques semble induire la

formation de pores dans la membrane interne des mitochondries (Levings, 1993). Le facteur X pourrait agir de la même façon et perturber le fonctionnement des mitochondries dans les cellules présentant simultanément le facteur X et la protéine spécifique de la smc. Ce mécanisme ne peut cependant pas expliquer la smc-Sprite du haricot, chez lequel, la toxicité d'ORF239 n'est apparemment pas liée à une localisation mitochondriale (Schnable et Wise, 1998).

Comme nous l'avons souligné précédemment, il semble que les besoins énergétiques soient très importants pendant la microsporogénèse. D'autre part, les phosphorylations oxydatives et la synthèse d'ATP sont des processus métaboliques vitaux pour les cellules. Le séquençage des gènes chimériques, associés aux smc étudiées, a montré la présence quasi permanente de séquences homologues de gènes mitochondriaux codant des sous-unités enzymatiques de la chaîne de transfert des électrons ou de l'ATPase. L'expression de ces gènes chimériques peut donc aboutir à la synthèse de polypeptides présentant des homologies avec les sous-unités enzymatiques normales codées par le génome mitochondrial. La sous-unité peut également être codée par un gène mitochondrial normal mais certains facteurs pourraient empêcher une maturation correcte du transcrit (épissage des introns, édition). Le produit de traduction ainsi formé serait alors incorrect. Enfin, la cotranscription des gènes chimériques avec un autre gène normal, entraînant la formation d'un messenger primaire différent du messenger ne contenant que le gène normal, pourrait gêner ou empêcher une maturation correcte du transcrit. Ces homologies de séquence, modifications de transcription, de maturation, d'édition entraîneraient la synthèse de polypeptides comparables aux sous-unités enzymatiques normales mais pas identiques. Du fait de ces homologies, ces polypeptides pourraient s'associer avec les autres sous-unités et conduire à la formation de complexes enzymatiques non fonctionnels. Comme les séquences codant les polypeptides normaux sont également présentes dans le génome mitochondrial, il est possible que des complexes fonctionnels et non fonctionnels soient présents simultanément dans les membranes des mitochondries des plantes mâle stériles. Cette situation permettrait une activité métabolique suffisante pour couvrir les besoins énergétiques dans les tissus végétatifs et dans les tissus reproducteurs femelles mais insuffisante dans certaines cellules des anthères. Ainsi, la microsporogénèse, qui nécessite un pic dans la production d'ATP, pourrait nécessiter une quantité trop importante d'ATP par rapport à la quantité d'ATP produite. D'autre part, l'existence de voies alternatives pour la production d'énergie (photophosphorylation, glycolyse) pourrait être suffisante dans tous les tissus de la plante sauf dans les anthères (Bonen et Brown, 1993). L'expression de la smc serait donc, dans cette hypothèse, le résultat d'un processus métabolique.

Bonen et Brown (1993) émettent l'hypothèse que certaines cellules de l'anthere pourraient avoir une physiologie particulière et ainsi être particulièrement sensibles à des dysfonctionnements de la mitochondrie. Les mitochondries pourraient également ne présenter ce dysfonctionnement que dans les cellules de l'anthere.

1.5. Intérêt de la SMC en recherche fondamentale

La smc est induite par des déterminants mitochondriaux mais elle est restaurée par des gènes nucléaires le plus souvent à effet dominant. Les gènes de restauration agissent généralement sur l'expression des séquences inductrices de stérilité mâle, en modifiant la maturation des transcrits (*Rfl*, smc-T du maïs, Kennel *et al.*, 1987), la stabilité des messagers (*Rfl*, smc-PET1 du tournesol, Smart *et al.*, 1994). La restauration des smc permet donc l'étude de l'influence de gènes nucléaires sur l'expression de séquences mitochondriales.

A l'issue de croisements récurrents entre espèces différentes fertiles, aboutissant au remplacement progressif du noyau du parent femelle par le noyau du parent mâle, des smc ont pu être obtenues. L'apparition de ces stérilités peut trouver son origine dans l'expression de séquences mitochondriales présentes chez le parent femelle ne s'exprimant que dans le contexte nucléaire du parent mâle, le noyau du parent femelle possédant des gènes de restauration. Ce résultat met également en évidence l'influence du noyau sur l'expression du génome mitochondrial mais dans ce cas l'étape de l'expression sur laquelle se fait cette régulation est inconnue (transcription, traduction ou mécanisme post-transcriptionnel).

L'étude de la smc-Ogura, par la présence de transcrits *orf138* possédant des régions 3' différentes, permet l'étude de l'influence de ces régions, et plus particulièrement des structures secondaires en boucle, sur la stabilité des messagers mitochondriaux (Bellaoui *et al.*, 1997).

La smc permet également de mettre en valeur le rôle fondamental des mitochondries dans la formation du pollen. Il est possible que la formation du pollen nécessite des synthèses énergétiques et/ ou des métabolites et/ ou un fonctionnement physiologique particulier. Dans cette hypothèse, l'étude de la smc, basée sur des comparaisons entre plantes fertiles, stériles, révertantes et restaurées, au niveau de la production d'ATP et d'autres composés permettra d'analyser les processus métaboliques et physiologiques particuliers associés au développement du gamétophyte mâle.

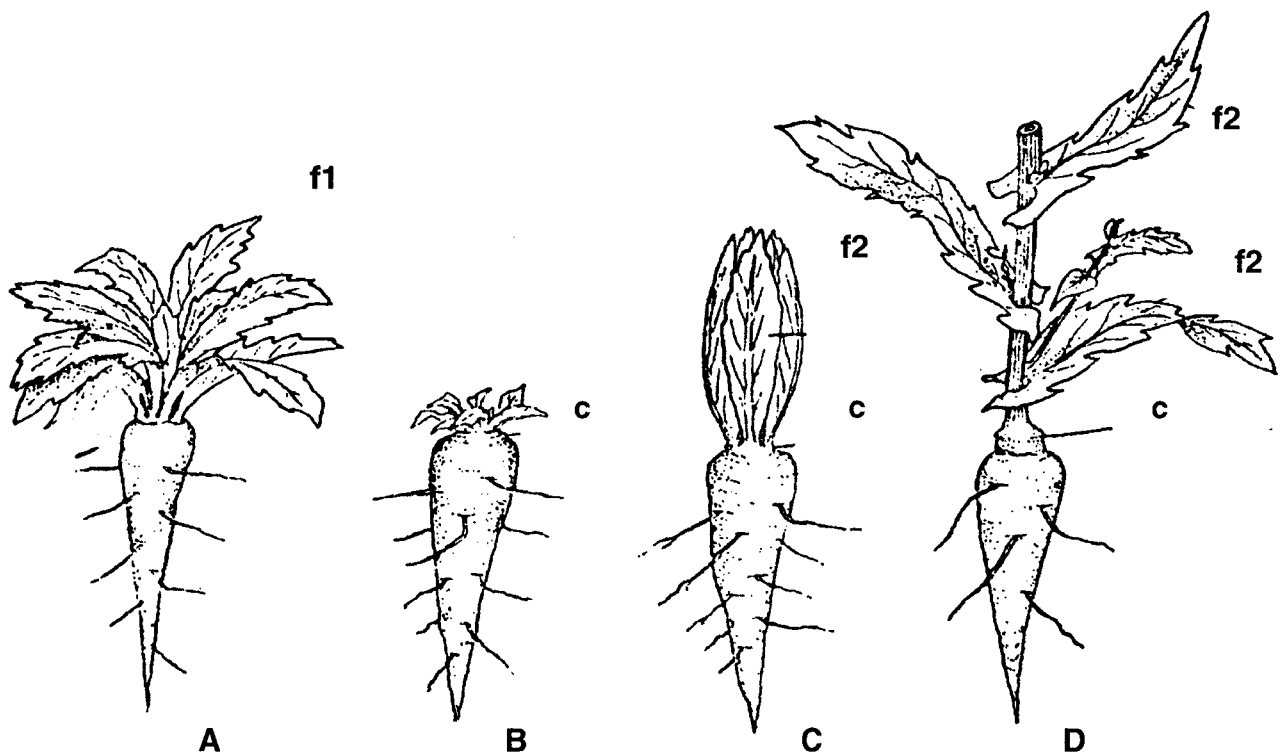


figure 9: Stades de développement de l'endive

- A: Stade rosette, été de la première année
- B: Hibernation, l'hiver de la première année
- C: Prémontaison, printemps
- D: Stade florifère, été de la deuxième année
- f1: feuilles de rosette, première année
- f2: feuilles de la base de la tige, deuxième année
- c: collet

Comme nous l'avons signalé précédemment la mitochondrie joue un rôle crucial pour la cellule puisqu'elle constitue sa centrale énergétique. Du fait de cette importance, l'étude de cet organelle est rendue difficile car on peut imaginer que la plupart des mutations mitochondriales sont létales et donc ne peuvent pas être étudiées. Chez les Angiospermes, deux types de mutations mitochondriales non létales sont observables et étudiables: la smc et les mutants correspondant à des délétions à phénotypes pléiotropes dont le mutant de maïs "NCS" (non chromosomal stripe) caractérisé par l'existence de secteurs nécrotiques dans les organes végétatifs, par une croissance ralentie et une faible production, constitue un exemple (Hunt et Newton, 1991).

1.6. La SMC chez la chicorée

1.6.1. Présentation du matériel

Les chicorées appartiennent à la famille des Astéracées. Le genre *Cichorium* comporte en Europe trois espèces différentes qui sont diploïdes ($2n=18$) : *Cichorium endivia* L., *Cichorium intybus* L. et *Cichorium spinosum*.

Les *C. endivia* L. rassemblent les différentes chicorées frisées et chicorées scaroles dont les feuilles sont consommées en salade.

Les *C. spinosum*, rencontrées dans les régions méditerranéennes sont intéressantes pour leur résistance à la sécheresse et au sel mais ne sont pas consommées.

Les *C. intybus* L. sont les chicorées amères. Dans cette espèce, on distingue les *C. intybus* L. var *sativum* ou chicorées industrielles et les *C. intybus* L. var *foliosum* cultivées pour leurs feuilles :

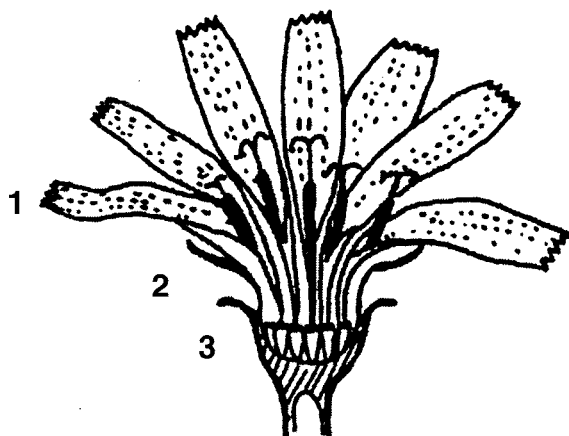
La chicorée industrielle est cultivée pour sa racine qui après torréfaction sert d'adjuvant au café et pour la production de polyfructosanes (inuline) comme fibre alimentaire et de fructose.

Parmi les *C. intybus* L. var *foliosum* on retrouve des chicorées cultivées pour la consommation de leurs feuilles rouges (Trévis, Vérone, Chioggia), panachées (Castelfranco) ou vertes (Pain de sucre, Barbe de capucin).

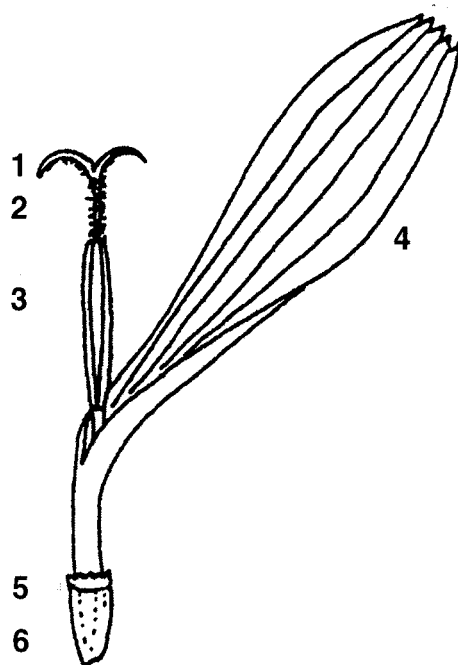
Enfin, les *C. intybus* L. var *foliosum* comprennent aussi la chicorée witloof (ou chicorée endive) cultivée pour son aptitude à former, après forçage, un gros bourgeon étioilé appelé endive (chicon). Le nom witloof vient du flamand et signifie feuille blanche.



Rameau florifère
(x0,3)



Capitule épanoui
(coupe longitudinale, x1,5)
1: ligule
2: double involucre de bractées
3: réceptacle floral



Fleur épanouie
(x5)
1: stigmate
2: style
3: manchon staminal
4: ligule
5: pappus
6: ovaire uniloculaire

Figure10: Morphologie de l'appareil floral de la chicorée

Les chicorées consommées proviennent de chicorées sauvages vivaces améliorées. Le présent travail porte sur la chicorée witloof ou chicorée de Bruxelles.

Les chicorées witloof (endives) et les chicorées industrielles sont bisannuelles puisque le cycle complet se déroule sur deux ans. Chez ces chicorées, la première année est marquée par la formation d'une racine pivot qui tubérise lors du premier été et accumule des réserves (fig. 9). Pendant cette première année, la plante développe une rosette de feuilles. Au cours de la deuxième année, une hampe inflorescentielle avec des bractées se développe et se ramifie (fig. 10). La chicorée présente un grand nombre d'inflorescences en capitules portant chacune une vingtaine de fleurs de couleur bleu-violet. Les fleurs ne restent épanouies que quelques heures et cette durée diminue lorsque la température augmente. Elles présentent des ovaires uniloculés. Les cinq pétales sont soudés et forment ainsi une ligule. Les étamines, au nombre de cinq, sont soudées pour former un manchon staminal bleu qui entoure le style. Le stigmate est bifide ou trifide. Les ovaires sont insérés sur le réceptacle floral orné par un double involucre de bractées.

Les chicorées endives sont de manière générale allogames entomophiles. La morphologie florale évite les autofécondations puisque les deux faces internes du stigmate sont accolées lorsque le style se développe et qu'il traverse le manchon staminal. Cependant, le taux d'autofécondation n'est pas négligeable puisqu'il peut atteindre 20 % chez certaines plantes. Comme les espèces *Cichorium intybus* L. et *Cichorium endivia* L. représentent un groupe de plantes d'importance économique notable, de nombreux programmes d'amélioration existent.

De 1850 à 1960, la chicorée endive a été améliorée par sélection massale dans laquelle seuls les individus les plus intéressants sur leur apparence étaient conservés comme reproducteurs. Cette méthode de sélection a conduit à une amélioration de la forme et de la compacité des chicons, mais les variétés populations ainsi obtenues ne présentaient pas une stabilité ni une homogénéité suffisantes. Les sélectionneurs ont alors obtenu, par autofécondations provoquées, des lignées fixées homogènes, utilisables dans les programmes d'amélioration. L'INRA de Versailles a ainsi obtenu, par autofécondation, une purification et une uniformisation grâce à l'obtention de lignées quasiment pures, celles-ci étant sélectionnées sur leur valeur propre (forme et compacité du chicon, absence d'amertume). Cependant, ces lignées présentaient une baisse relative de vigueur ainsi qu'une baisse de rendement de 20 % par rapport aux populations, due à la dépression de consanguinité, empêchant leur exploitation commerciale directe. Ce problème a été résolu par la production de variétés cultivées hybrides F_1 obtenues par la combinaison de deux lignées pures sélectionnées. L'obtention d'hybrides chez l'endive est basée sur le système de compétition

pollinique. Ces variétés hybrides F_1 présentent une amélioration au niveau de la stabilité, de l'homogénéité et de la production par rapport aux variétés population (compacité du chicon, vigueur, augmentation du rendement, tolérance à l'axe brun, moindre amertume...).

1.6.2.Importance économique de la chicorée (chicorée endive, chicorée industrielle)

La France est le premier producteur d'endives devant la Belgique et les Pays-Bas produisant environ 250 000 t par an. Ce sont surtout les régions du Nord de la France (Pas-de-Calais, Nord et Somme) ainsi que la Bretagne qui assurent cette production. Les endives sont bien sûr importantes au niveau de la production agricole puisque leurs feuilles sont consommées en salade, crues ou cuites. Elles sont peu énergétiques et contiennent peu de nitrates (100 à 300 mg/kg). Les racines des chicorées endives peuvent entrer dans la composition de l'alimentation du bétail. La lactucine, contenue dans le latex des chicorées et responsable de l'amertume du chicon, peut être utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour ses propriétés sédatives.

Les racines des chicorées industrielles, très énergétiques, quant à elles, et pauvres en cellulose, sont utilisées, après torréfaction, comme adjuvant du café et dans l'industrie agroalimentaire puisqu'elles permettent la production de sirops riches en fructose.

1.6.3.Intérêt de la SMC chez la chicorée

La production de semences hybrides se basant sur la compétition pollinique dans le but d'obtenir des fécondations croisées, ne permet pas la production de 100 % de semences hybrides car la chicorée n'est pas allogame stricte. La stérilité mâle peut donc être considérée comme un outil de choix dans les programmes d'amélioration variétale pour la production de 100% d'hybrides. Des smn récessives ont été détectées chez des chicorées sauvages et introduites chez la chicorée industrielle (smn "Edith" et "Laurence") et certaines chicorées endives. Chez la chicorée industrielle, l'utilisation de ces smn dans les programmes d'amélioration se révèle délicate et coûteuse. Pour l'instant, ces smn ne sont pas utilisées dans les programmes d'amélioration de la chicorée endive. La smc n'a jamais été observée à l'état naturel et n'a jamais été obtenue à l'issue de croisements inter- et intra-spécifiques chez ces deux espèces.

1.7. Situation du sujet

1.7.1. Obtention de chicorées mâle stériles

En raison de leur autocompatibilité, le taux d'hybridité des lots de semences de chicorées varie de 60 à 90% (Bellamy *et al.*, 1996). Ce taux d'hybridité des lots de semences n'est pas suffisant pour les producteurs d'endives. En effet, les endives produites sont classées en trois catégories (extra, I, II) en fonction de caractéristiques bien définies (forme, tailles, couleur, amertumes, état sanitaire, qualités gustatives...), or la qualité du chicon dépend pour une large part des caractères génétiques de la plante (forme, couleur, qualités organoleptiques). Pour les producteurs, la présence de plantes provenant de graines issues d'autofécondation donne des chicons de tailles et de qualité réduites ce qui diminue la qualité de la production. Pour la production de semences, l'utilisation d'une smc dans les programmes d'amélioration devrait permettre de garantir la production de semences 100 % hybride. Comme la smc n'existe pas naturellement chez le genre *Cichorium*, des fusions de protoplastes ont été réalisées puisque l'hybridation somatique a permis, dans de nombreux cas, d'induire des événements de recombinaison entre les génomes mitochondriaux des protoplastes fusionnés.

1.7.2. Choix du tournesol

Le tournesol et la chicorée appartiennent à la famille des Astéracées mais ne font pas partie de la même sous-famille, ce qui interdit les croisements directs. La chicorée appartient à la sous-famille des cichorioïdées (groupe des lactucées) alors que le tournesol appartient à la sous-famille des astéroïdées (groupe des hélianthées). Le tournesol a été choisi pour les fusions de protoplastes car il est phylogénétiquement assez éloigné des chicorées, ce qui élimine le risque de fusion entre les noyaux. D'autre part, le tournesol est suffisamment proche des chicorées pour permettre des recombinaisons entre les génomes mitochondriaux. Bien que les déterminants de la smc soient très divers, une variété mâle stérile a été choisie pour réaliser les fusions de protoplastes, dans l'hypothèse où la smc du tournesol pourrait fonctionner chez la chicorée.

1.7.3. Fusions de protoplastes

Des fusions ont donc été réalisées entre des protoplastes de mésophylle de chicorée industrielle fertile (*Cichorium intybus* L. var. Pévèle) et des protoplastes d'hypocotyles de tournesol stérile (*Helianthus annuus* L. var. Mirasol) portant la smc-PET1 décrite par Leclercq (1969) (Rambaud *et al.*, 1993). Les deux catégories de protoplastes ont été fusionnées par une méthode utilisant du PEG associé à des ions calciques et un pH basique

(visant à réduire les forces de répulsion existant entre les protoplastes chargés négativement). A la suite des fusions, environ 25 % d'hétérocaryons ont été obtenus. Il faut signaler que, dans nos conditions de culture (Rambaud *et al.*, 1993), les protoplastes de tournesol sont incapables de régénérer des plantes. En effet, toutes les plantes régénérées à l'issue des fusion présentaient un phénotype de chicorée. Parmi les 600 chicorées industrielles régénérées, 16 plantes présentaient un phénotype mâle stérile ou totalement stérile. Certaines plantes ne présentaient, en effet, ni style, ni anthère. Certaines plantes présentaient des anthères brunes renfermant du pollen non viable. D'autres plantes présentaient des fleurs sans anthères. D'autres, enfin, présentaient des anthères résiduelles sans pollen. L'étude de la ségrégation du caractère mâle stérile, dans la descendance, a permis de déterminer que les stérilités mâles observées étaient de type nucléocytoplasmique puisque cette stérilité présentait une hérédité maternelle.

1.7.4. Transfert des cytoplasmes 411, 523 et 524 dans différents types de chicorées

Parmi les plantes mâle stériles obtenues à l'issue des fusions de protoplastes, trois plantes (411, 523, 524) ont été retenues pour leur vigueur. Elles sont actuellement étudiées au laboratoire. Ces trois cytoplasmes ont également été choisis par l'équipe d'amélioration de la chicorée de l'INRA de Versailles pour être transférés dans un contexte chicorée endive (*Cichorium intybus* L. cultigroupe witloof) par le biais de rétrocroisements successifs aboutissant au remplacement progressif du noyau *C. intybus* L. var. Magdebourg par le noyau *C. intybus* L. var. witloof. La stabilité et l'expression de la smc ont été observées pendant plusieurs générations. Les chicorées mâle stériles ont également été observées afin de mettre en évidence d'éventuels défauts des plantes porteuses de ces cytoplasmes qui empêcheraient leur exploitation au niveau agronomique (défaut dans la photosynthèse, manque de vigueur, sensibilité à certaines maladies ou certains ravageurs, baisse de la fertilité femelle, baisse du pouvoir germinatif, diminution de la production de nectar).

1.7.5. Objectif de la thèse

Le matériel choisi pour nos travaux possède les cytoplasmes 411, 523 et 524 qui ont été choisis à l'INRA de Versailles, ce qui a permis une collaboration avec L. Bouldard qui a effectué les croisements avec différentes lignées de chicorées endives pour réaliser le transfert des cytoplasmes inducteurs de smc dans la chicorée endive.

Les premières analyses moléculaires, effectuées sur ces cytoplasmes, par Rambaud *et al.* (1993, 1997) ont montré que les génomes mitochondriaux des plantes analysées étaient

différents entre eux, qu'ils contenaient des fragments d'ADNmt caractéristiques du tournesol mâle stérile et qu'ils présentaient une instabilité au cours des premières générations de rétrocroisements avec des chicorées industrielles, *C. intybus* L. var. Magdebourg.

Nous avons voulu savoir si le déterminant de la smc du tournesol PET1 (*orf522*) avait été transféré chez les trois chicorées 411, 523 et 524 à l'origine des différents cytoplasmes étudiés. Dans les cas où ce déterminant serait présent, nous voudrions savoir dans quel contexte il a été intégré au génome mitochondrial des chicorées, s'il s'exprime dans ce contexte et s'il est à l'origine de la smc des chicorées. Nous avons également cherché à savoir si les génomes mitochondriaux étaient en voie de stabilisation et si les génomes mitochondriaux des chicorées 411, 523 et 524 sont identiques ou présentent des différences. Nous avons réalisé une étude de la structure des génomes mitochondriaux de ces trois cybrides dans différents contextes nucléaires afin de déterminer l'influence éventuelle du noyau sur la stabilisation du génome mitochondrial.

Matériels et Méthodes

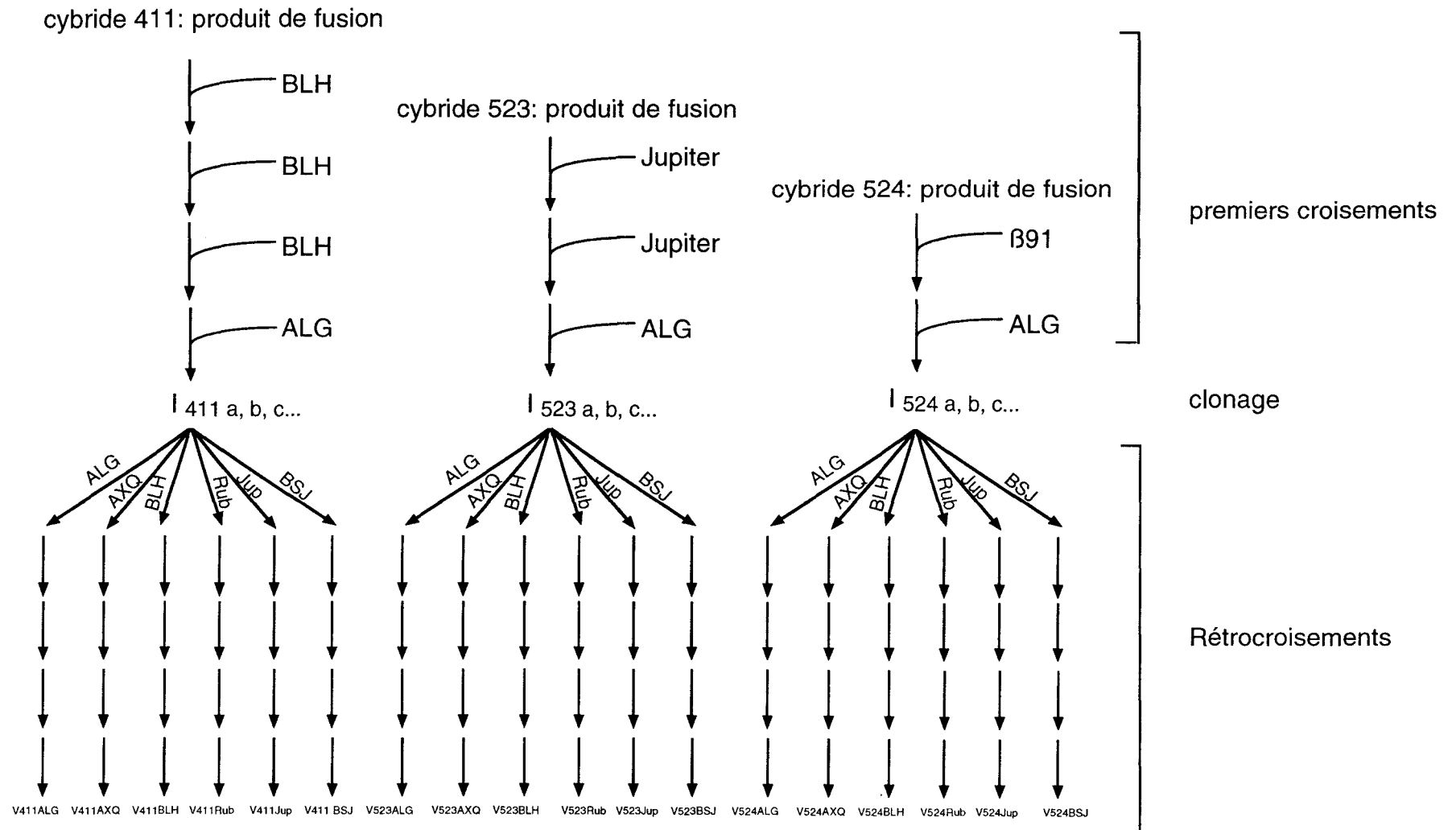


Tableau 2: Schéma des croisements effectués sur les cybrides 411, 523 et 524. Les plantes l411a, b, c..., l523a,b,c... et l524a, b, c... constituent la première série de plantes analysées. Elles proviennent respectivement du clonage des plantes l411, l523 et l524 ayant déjà subi plusieurs croisements par différents pollinisateurs. Les plantes V_{411α, β, γ...}, V_{523 α, β, γ...} et V_{524 α, β, γ...} constituent la deuxième série de plantes analysées. Ces plantes ont déjà subi 5 rétrocroisements par différents pollinisateurs (ALG, AXQ, BLH, Rub, Jupiter).

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels

Afin d'obtenir des chicorées mâle stériles, des fusions de protoplastes de mésophylle de chicorées industrielles fertiles et d'hypocotyles de tournesol mâle stériles, présentant la smc de Leclercq (1969, 1971), ont été réalisées. A l'issue de ces fusions, 16 plantes mâle stériles ont été obtenues. Parmi ces 16 plantes, les cybrides 411, 523 et 524, provenant d'événements de fusion différents, sont étudiés dans ce travail. Chacun de ces trois produits de fusion a d'abord subi deux rétrocroisements par la chicorée industrielle Pévèle puis différents croisements par des chicorées endives au sein des "Etablissements Florimond-Desprez" (tableau 2). Par la suite, l'INRA de Versailles a acquis ces trois cybrides dans le but de transférer les cytoplasmes d'un contexte nucléaire de chicorée industrielle (chicorée à café) à un contexte nucléaire de chicorée witloof (chicorée endive). Les cybrides ont été étudiés, au cours de ce travail, à différents stades de rétrocroisements. L'étude a consisté en une comparaison des résultats obtenus pour les cybrides avec les résultats obtenus pour les plantes considérées ici comme témoins c'est à dire les deux parents de fusion, la chicorée industrielle fertile, Pévèle, et le tournesol à smc Mirasol. Les chicorées witloof ayant servi de parents mâles lors de rétrocroisements ont également servi de témoins.

2.1.1. Propagation par culture *in vitro* d'une plante de chaque cytotype: Première série étudiée.

Tout d'abord, 1 plante de chaque cytotype, présentant une morphologie florale de type sans anthère, a été choisie et multipliée végétativement par culture *in vitro* afin de disposer de suffisamment de matériel dans le but de réaliser une analyse moléculaire sur un premier groupe de plantes. Lors de cette culture *in vitro*, des bourgeons de chicorée ont été régénérés à partir de structures secondaires se formant sur des fragments de feuilles cultivés en présence de BAP (0,1 mg/l).

Les trois plantes, 411, 523 et 524, ayant été propagées avaient déjà subi les rétrocroisements suivants :

- la plante 411 choisie avait déjà été croisée 2 fois par la chicorée industrielle Pévèle puis 3 fois par une chicorée witloof portant un noyau de type BLH puis une fois avec une chicorée witloof portant un noyau de type ALG.

- la plante 523 choisie avait déjà été croisée 2 fois par la chicorée industrielle Pévèle puis 2 fois par une chicorée witloof portant un noyau de type Jupiter puis une fois avec une chicorée witloof portant un noyau de type ALG.

- la plante 524 choisie avait déjà été croisée 2 fois par la chicorée industrielle Pévèle puis 1 fois par une chicorée witloof portant un noyau de type B91 puis une fois avec une chicorée witloof portant un noyau de type ALG.

Les trois premiers groupes de plantes (411, 523 et 524) présentent donc un noyau hybride chicorée industrielle/ chicorée endive.

2.1.2.Obtention d'une descendance de chaque cytotype dans différents contextes nucléaires, après cinq générations de rétrocroisements: Seconde série étudiée:

Chacune des trois plantes choisies pour la multiplication par culture *in vitro* a également été rétrocroisée pendant plusieurs générations successives avec des chicorées witloof présentant les noyaux ALG ou AXQ ou BLH ou BSJ ou Rub ou Jupiter. Ces noyaux peuvent être classés en deux grandes catégories: les noyaux de type A (ALG, AXQ, Jupiter) et les noyaux de type B (BLH, BSJ, Rub). Les noyaux de types A et B ont été définis l'un par rapport à l'autre vis à vis de leur bonne aptitude aux croisements. Cette seconde série étudiée est constituée de plantes ayant déjà subi 5 générations de rétrocroisements dans les différents contextes nucléaires cités ci-dessus.

Lors des tous premiers croisements effectués à l'issue des fusions de protoplastes, Rambaud *et al.* (1993) ont constaté une ségrégation dans les descendance quant au caractère de smc mais, au cours des générations successives, le pourcentage de plantes mâle stériles a augmenté. Par précaution, la morphologie des fleurs des cybrides a été observée pour chaque plante analysée au niveau moléculaire afin de s'assurer que les plantes étudiées étaient bien mâle stériles.

Pour cela, toutes les plantes ont été vernalisées à 7°C pendant deux mois (photopériode de 16 heures d'obscurité et 8 heures de lumière).

Les extractions d'ADN total ont été réalisées à partir de jeunes feuilles de plantes cultivées en serre pour les cybrides et pour les témoins chicorées fertiles.

Les extractions d'ARN total ainsi que les synthèses *in organello* ont été effectuées à partir de boutons floraux.

Des jeunes germinations étiolées de tournesol Mirasol, cultivées en serre, ont été utilisées pour les extractions d'ADN et d'ARN totaux. Par contre, ce sont des germinations cultivées *in vitro* qui ont été utilisées afin de réaliser les synthèses *in organello*.

2.2. Méthodes

2.2.1. Méthodes de biologie moléculaire

2.2.1.1. Extraction des acides nucléiques

2.2.1.1.1. A partir de bactéries - Maxi Préparation d'ADN plasmidique

Une préculture bactérienne est d'abord réalisée en ensemençant 5 ml de milieu LB liquide stérile, contenant de l'ampicilline à 50 µg/ml (gène de résistance à l'ampicilline contenu dans le plasmide pAT153), par une colonie provenant d'une culture en milieu LB solide, pendant une nuit à 37°C sous agitation. Une deuxième culture de 200 ml est ensuite effectuée dans les mêmes conditions en ensemençant les 200 ml à partir de 2 ml de la préculture.

Les 200 ml sont centrifugés à 5 000 g pendant 20 minutes. Le culot est repris dans 100 ml de tampon STE froid en mélangeant vigoureusement. La solution est alors centrifugée comme précédemment. Au culot sont additionnés 10 ml de solution I par une agitation vigoureuse. Le tout est placé 5 minutes dans la glace. Par la suite, 20 ml d'une solution de NaOH (0,2 M) et de SDS (1% p/v), préparée extemporanément, sont ajoutés en mélangeant doucement. Le tout est laissé 5 à 10 minutes à température ambiante. Quinze ml de solution III sont ajoutés en mélangeant pour homogénéiser les deux phases et laissés de nouveau pendant 15 minutes dans la glace. Après centrifugation (5000 g), le surnageant est récupéré par filtration à travers une couche de Miracloth. Les acides nucléiques sont alors précipités dans la glace pendant 10 minutes par addition de 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation, le culot d'acides nucléiques est rincé dans de l'éthanol 70%. Une fois séché, le culot est resuspendu dans 4 ml de tampon TE. Les contaminations protéiques sont extraites par un phénol/chloroforme. Une nouvelle précipitation est effectuée par la suite, le culot d'ADN est finalement repris dans 2 ml de tampon TE et peut être stocké sous cette forme à -20°C.

Tampon STE:

NaCl	0,1 M
Tris-HCl pH 8,0	10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Milieu LB:

extrait de levure	5 g/l
Tryptone	10 g/l
NaCl	5 g/l

Milieu LB gélosé:

Milieu LB + 12 g Agar/l

Solution I:

glucose	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Autoclavé et stocké à 4°C

Solution III:

acétate de potassium	3 M
acide acétique glacial	11,5% v/v

2.2.1.1.2. A partir de plantes

2.2.1.1.2.1. Extraction d'ADN total:

L'extraction est réalisée d'après la méthode de Dellaporta *et al.*(1983). Les feuilles de chicorée ou les hypocotyles de tournesol (1 g) sont prélevés et aussitôt congelés dans de l'azote liquide puis broyés jusqu'à obtention d'une poudre fine. Le broyât est repris dans 20 ml de Tampon G₁ additionné de 1,4 ml de SDS à 20% et mélangé au Vortex. Le mélange obtenu est placé pendant 15 minutes à 65°C. Au bout de ce temps, 6,6 ml d'acétate de potassium (5 M, pH 8) sont ajoutés. Après homogénéisation, le mélange est placé pendant 30 minutes à 0°C puis centrifugé pendant 15 minutes à 9 500 t/ mn à 4°C. Le surnageant est filtré à travers une couche de Miracloth et additionné de 14 ml d'isopropanol. Après avoir homogénéisé délicatement, le tout est placé pendant 20 minutes à -20°C afin de précipiter les ADN qui sont ensuite culottés par centrifugation. Le culot est repris dans 1,4 ml de tampon G₂ et laissé à 37°C jusqu'à complète dissolution en présence de RNase A à 10 mg/ ml (Sigma). Après traitement à la RNase, l'ADN est reprécipité par 1 ml d'isopropanol et 150 µl

d'acétate de sodium (3 M, pH 8) et laissé pendant 30 minutes à -20°C. Après centrifugation, le culot d'ADN est rincé avec de l'éthanol à 70% puis redissous dans du tampon TE. Après dissolution, les contaminations protéiques sont extraites par un traitement avec du phénol (pH 8), puis du phénol (pH 8) /chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1), du chloroforme/alcool isoamylique (24/1) et enfin de l'éther (saturé en TE) qui est évaporé au Speed-Vac (Speed Vac DNA 110, Savant). Les ADN sont de nouveau précipités par 1/10^e de volume d'acétate de sodium (3 M, pH 8) et 2 volumes d'éthanol. Les ADN sont alors culottés par centrifugation à 11 000 g pendant 10 minutes, puis dissous dans du tampon TE.

Tampon G1 :

Tris-HCl pH 8	100 mM
EDTA	50 mM
NaCl	500 mM
β-Mercapto-éthanol	10 mM

Tampon G2 :

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM

Tampon TE :

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

2.2.1.1.2.2.Extraction d'ARN totaux.

L'extraction est réalisée d'après la méthode de Dean *et al.*(1985). Cinq g de matériel sont récoltés et stockés immédiatement dans la glace avant de commencer rapidement l'extraction par un broyage dans l'azote liquide. Le broyat est mélangé à 9 ml de tampon NTES et 6 ml d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Les échantillons sont alors vortexés pendant 5 minutes puis centrifugés à 8 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et additionné d'1/10^e de volume d'acétate de sodium (2 M, pH 5.5) et de 2 volumes d'éthanol 95%. Les tubes sont alors placés pendant au moins 10 minutes à -20°C. Ils sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 8 000 g. Le culot est repris dans 2,5 ml d'H₂O DEPC auxquels on ajoute ensuite 2,5 ml d'acétate de lithium 4 M. Ce mélange est placé pendant au moins 3 heures dans la glace. Les tubes sont centrifugés à 20 000 g pendant 10 minutes. Le culot est dissous dans 1,8 ml d'H₂O DEPC puis reprécipité par 180µl d'acétate de sodium (2 M, pH 5,5) et de 3,6 ml d'éthanol 95%, placés pendant 10

minutes à -20°C. Après centrifugation, le culot d'ARN est rincé dans de l'éthanol à 70%, séché et puis repris dans 250 µl d'H₂O DEPC. A ce stade, une étape de purification par un mélange de phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (25/24/1) est possible.

Tampon NTES :

NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	1 %

2.2.1.2. Analyse des acides nucléiques

2.2.1.2.1. Digestion d'ADN total de plantes

Pour chaque échantillon analysé, 10 µg d'ADN sont digérés pendant une nuit, dans un volume total de 30 µl, par 10 U de diverses enzymes de restriction (*EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, Appligène) dans le tampon et à la température (37°C) qui leur sont appropriés en présence de spermidine à 10 mM (Sigma). La digestion est stoppée en plaçant les échantillons à 4°C.

2.2.1.2.2. Electrophorèse des gels d'ADN

Une fois la digestion stoppée, les ADN digérés sont additionnés d'1/10 de volume de tampon de charge et déposés sur un gel d'agarose à 0,8% dans du TAE 1x. La migration s'effectue pendant la nuit à 50V.

TAE 10x :

Tris-Acétate pH 8	400 mM
EDTA, 4Na pH 8	20 mM

Tampon de charge :

Saccharose 40%	
Bleu de Bromophénol 0,25% (p/v)	
H ₂ O qsp 10 ml	

2.2.1.2.3. Transfert des gels d'ADN

Les gels sont transférés sur une membrane de Nylon (Hybond N, Amersham) sous vide à 50 mbar dans un vacuum-blotter Vacugene XL (Pharmacia Biotech). Avant le

transfert, le gel est dépuriné par de l'HCl 0,25 N pendant 5 minutes, dénaturé pendant 5 minutes dans le tampon de dénaturation, neutralisé dans la solution de neutralisation pendant 5 minutes. Le transfert s'effectue dans du SSC 20x pendant 1 heure. A la suite du transfert, la membrane est fixée à 80°C pendant 2 heures.

Solution de dénaturation:

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

Solution de neutralisation:

NaCl 1,5 M

Tris-HCl pH 7,2 0,5 M

Na₂EDTA 1 mM

SSC 20x:

NaCl 3M

Tri-sodium citrate pH 7 300 mM

2.2.1.2.4. Electrophorèse des gels d'ARN

Les électrophorèses d'ARN sont réalisées en conditions dénaturantes dans du tampon MOPS 1x sur un gel à 1,5% d'agarose contenant du MOPS (1 M) et du formaldéhyde (8% v/v). Tout le matériel est préalablement traité au SDS (essuyé au SDS 20%, placé pendant 1 heure au contact de SDS 1% puis rincé dans de l'eau autoclavée) afin d'éliminer toute trace de RNase. Vingt µg d'ARN totaux sont dénaturés à 65°C pendant 10 minutes en présence de tampon de charge ARN puis placés dans la glace. Ils sont alors déposés sur gel, la migration s'effectue pendant la nuit à 50 V.

Tampon de charge ARN:

formamide désionisée	825 µl
formaldéhyde	188 µl
MOPS 10x	100 µl
glycérol 100%	50 µl
solution saturée de Bleu de Bromophénol	30µl

2.2.1.2.5. Transfert des gels d'ARN

Le gel d'ARN n'est soumis à aucun traitement particulier, il est simplement rincé quelques minutes dans de l'H₂O DEPC. Les ARN sont transférés sur une membrane en Nylon (GeneScreen, Dupont) pendant la nuit dans du SSPE 20x par capillarité. La membrane après transfert est fixée sous U.V. (1200 J), rincée quelques minutes dans du SSPE 2x puis placée pendant 2 heures à 80°C.

SSPE 20x:

NaCl	2,9 M
NaH ₂ PO ₄ (2H ₂ O) pH 7,4	200 mM
EDTA	20 mM

2.2.1.2.6. Hybridations

2.2.1.2.6.1. Marquage des sondes

Cinquante ng d'ADN matrice sont dénaturés pendant 10 minutes à 100°C et rapidement refroidis dans la glace. Les sondes sont alors synthétisées radioactivement par incorporation d' α ³²PdCTP par extension d'amorces multiples en utilisant le kit de marquage T7 Quick prime (Pharmacia) comprenant les amorces multiples, tous les nucléotides sauf le dCTP, la T7 polymérase, le tampon lui correspondant. Le marquage s'effectue à 37°C pendant 45 minutes. La sonde est alors purifiée par passage sur une colonne de Sephadex G50 (Pharmacia).

2.2.1.2.6.2. Préhybridations des membranes.

Les membranes sont préhybridées pendant 4 heures à 42°C dans du tampon de préhybridation (10 ml) contenant de l'ADN de sperme de hareng (200 µg/ml) dénaturé.

Tampon de préhybridation des Southern:

Formamide désionisée	50% v/v
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (1/1)	0,1 M
SDS	0,1% p/v

SSC 5x

solution de Denhardt's 5x

SSC 20x

NaCl 0,75 M

Trisodium citrate pH 7 0,375 M

solution de Denhardt's 100x

Ficoll 400 2% p/v

PVP 2% p/v

BSA 2% p/v

Tampon de préhybridation des northern:

EDTA 1 mM

formamide 50% v/v

SDS 0,1% p/v

solution de Denhardt's 5x

SSPE 5x

2.2.1.2.6.3.Hybridations des membranes

Le tampon de préhybridation est remplacé par du tampon d'hybridation contenant de l'ADN de sperme de hareng dénaturé (200 µg/ ml) et la sonde marquée et dénaturée. L'hybridation s'effectue à 42°C pendant la nuit. Pour les northern, le tampon d'hybridation est le même que celui utilisé pour la préhybridation.

Tampon d'hybridation des Southern:

NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (1/1) 0,05 M

SSC 5x

solution de Denhardt's 1x

Formamide désionisée 50% v/v

SDS 0,2% p/v

2.2.1.2.6.4. Lavage des membranes

Après hybridation, les Southern sont lavés à 42°C dans des bains successifs d'environ 20 minutes de solutions contenant du SDS 0,1% (p/v) et des concentrations décroissantes de SSC (SSC x6, SSC x2, SSC x0,2). Pour les northern, les lavages se pratiquent dans les mêmes conditions mais le SSC est remplacé par du SSPE.

Lorsqu'on estime les lavages suffisants par une mesure au compteur Geiger, les membranes sont recouvertes d'un film autoradiographique (Hyperfilm-MP, Amersham) dans une cassette contenant un écran intensificateur. La cassette est placée à -80°C. Le film est révélé au bout de 24 heures minimum.

2.2.1.2.6.5. Déshybridations des membranes

Pour permettre une réutilisation ultérieure des membranes, celles-ci sont déshybridées dans du SDS 0,1% (p/v), préalablement porté à ébullition, jusqu'à complet refroidissement.

2.2.1.2.7. Synthèse d'ADNc par transcription inverse

Afin d'éliminer toute présence d'ADN dans les extraits d'ARN, 50 µg d'ARN total sont traités par 10 U de DNase-RNase free (Boehringer) à 37°C pendant 30 minutes. La DNase est éliminée par un traitement au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). L'ARN est ensuite précipité à l'éthanol. Vingt-cinq µg d'ARN traités à la DNase, sont utilisés pour la transcription inverse réalisée par 200 U de transcriptase inverse Super Script™ RNase H⁻ (GIBCO BRL) dans son tampon, en présence de 1,25 mM de dNTP, de RNasine (80 U) et de DTT 10 mM. Vingt-cinq autres µg d'ARN, également traités à la DNase, sont placés dans les mêmes conditions mais en absence, cette fois, de transcriptase inverse. Cette deuxième réaction tient lieu de contrôle négatif car elle permet de vérifier, lors de la PCR, que l'amplification est obtenue à partir d'ADNc et non d'ADN contaminant. Les mélanges sont incubés pendant 2 heures à 37°C. La réaction est ensuite stoppée à 100°C pendant 5 minutes.

2.2.1.2.8. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Le mélange réactionnel utilisé pour la PCR contient soit 2 µl d'ADNc synthétisés pour la RT-PCR ou 75 ng d'ADN pour la PCR. En plus des matrices utilisées pour l'amplification, le mélange contient 0,2 mM de chaque dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq polymérase (Eurobio) en présence de son tampon. Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur Trio Thermoblock (Biometra) qui est programmé pour un précycle de 3 mn

à 94°C, 30 cycles comprenant chacun 3 étapes : 30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C, 1 minute à 72°C. La réaction est achevée par une étape de 5 minutes à 72°C. Les amplifications sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl.

Pour l'amplification du gène *atpA*, les amorces A₁ et A₂, hybridant respectivement la région 5' et 3' du gène, sont utilisés:

- A₁ : GGA ATT CTC TCC GAG AGC TGC TG
- A₂ : GTG TAA GGC AAA GCG CAT TCC

Pour l'amplification de la séquence *orf522*, les amorces A₂₃ ou A₃₈, hybridant la région 5', et A₂₆ ou A₃₉, hybridant la région 3' de la séquence, sont utilisés:

- A₂₃ : CCC CCT CCC TGG TGG ATC CGG CG
- A₂₆ : CCC TCT ATG AGT ACC GTT CTC TCA CG
- A₃₈ : ATG CCT CAA CTG GAT AAA TTC ACT TAT TTC
- A₃₉ : TGA GTA CCG TTC TCT CAC GAG TTG AAG

D'après la séquence *atpA-orf522* du tournesol, les tailles attendues des fragments d'amplification, chez le tournesol, sont les suivantes:

- A₁/A₂: 1523 pb
- A₂₃/A₂₆: 343 pb
- A₃₈/A₃₉: 521 pb
- A₁/A₂₆: 2223 pb

2.2.1.2.9. Clonage et Séquençage

Le fragment de 800 pb, amplifié par PCR, a été cloné dans le plasmide pTag en utilisant le kit de ligation LigATor kit (R& D Systems Europe Ltd, 4-10 The Quadrant, Barton Lane, Abingdon, OX14 3YS, UK). Par la suite, le séquençage a été réalisé en utilisant la méthode des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977) en suivant le protocole fourni avec le kit "Thermosequenase" (Amersham, Pharmacia Biotech.). La recherche d'homologies de séquence a été effectuée en consultant la base de données Genbank/ EMBL.

2.2.2.Préparation des sondes mitochondriales

Les sondes *atpA*, *atp6*, *atp9*, *coxII*, *coxIII*, *cob*, *rrn18*, *rrn26* correspondent aux séquences des gènes mitochondriaux du maïs clonées dans le plasmide pBluescript KS+ (Muisse *et al.*, 1992). La sonde correspondant à la séquence *orf522* du tournesol *smc* est également clonée dans le plasmide pBluescript KS+. La sonde *coxI*, correspondant à la séquence du gène du maïs est, quant à elle, clonée dans le plasmide pAT153.

La sonde *coxI* est préparée à partir d'une colonie bactérienne contenant le plasmide pAT153 dans lequel a été inséré un fragment *EcoRI/BamHI* de 3,95 kb correspondant au gène *coxI* du maïs (Leaver). Afin de libérer le fragment de 3,9 kb, 10 µg d'ADN plasmidique sont digérés par les enzymes *EcoRI* et *BamHI* (Appligène) en présence d'un tampon approprié à ces 2 enzymes à 37°C pendant 2 heures. Les produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse en tampon TAE 1x sur un gel d'agarose Multipurpose à 1% (p/v) contenant du BEt à 3 µg/ml. Le fragment de 3,9 kb, correspondant à l'insert, est prélevé sous U.V. Il est purifié en utilisant le kit Jet Sorb (Bioprobe).

Les sondes *atpA*, *atp6*, *atp9*, *coxII*, *coxIII*, *cob*, *rrn18*, *rrn26* et *orf522* sont clonées dans pBluescript. Ce plasmide contient les séquences des amorces universelles M13 sens et antisens dans son site multiple de clonage:

M 13 sens : 5' AACAGCTATGAC CATG 3'

M 13 antisens : 3'TGACCGGCAGCAAAATG 5'

Les sondes contenues dans ce plasmide sont amplifiées par PCR en utilisant ces 2 amorces. Les amplifications sont réalisées dans un volume de 15 µl contenant 1 ng de plasmide, 0,15 U de Taq polymérase (Appligène), le tampon correspondant à l'enzyme, du MgCl₂ (1 mM), les dNTP (0,1 mM), les amorces sens et antisens (0,27 pM). La réaction de PCR est réalisée dans un Thermocycleur Perkin Elmer 2400 et comporte un précycle d'1 minute à 94°C, 25 cycles comprenant chacun 3 étapes : 1 minute à 94°C, 2 minutes à 55°C, 1 minute à 72°C. La réaction est achevée par une synthèse finale de 1 minute à 72°C. Après la PCR, une aliquote de chaque réaction est déposée sur gel afin de vérifier la conformité des fragments amplifiés par rapport aux tailles attendues.

2.2.3.Méthodes d'analyse des protéines

2.2.3.1.Isolement des mitochondries

Huit g de boutons floraux de chicorée ou de jeunes germinations de tournesol sont récoltés et placés dans la glace au fur et à mesure des prélèvements. L'isolement des mitochondries s'effectue à 4°C afin de préserver leur intégrité. Lorsque tous les échantillons sont prélevés, ils sont stérilisés pendant 5 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium 1% (p/v), NaCl 1% (p/v) et Tween 20 0,25% (v/v) puis rincés 5 fois dans de l'eau stérile. Les échantillons sont alors essorés dans du papier stérile. Ils sont ensuite broyés rapidement dans des mortiers avec des billes de verre en présence de 20 ml de tampon de broyage. Le broyat est filtré sur 2 couches de Miracloth (pour éliminer les gros débris cellulaires et les noyaux) puis centrifugé pendant 5 minutes à 6 000 g. A l'issue de cette centrifugation, qui élimine la majorité des chloroplastes et des petits débris cellulaires, le surnageant est centrifugé de nouveau pendant 20 minutes à 18000 g afin de culotter les mitochondries. Le culot est alors repris délicatement à l'aide d'un pinceau dans 1,4 ml de tampon de resuspension afin de préserver l'intégrité des mitochondries puis à l'aide d'un potter de Thomas à large diamètre qui permet de supprimer les agrégats d'organites. L'extrait brut de mitochondries est purifié sur un gradient de Percoll. Les gradients (45%, 26%, 13%) sont centrifugés pendant 35 minutes à 12 000 rpm (rotor SW 20I Beckman). L'interface blanchâtre 45%-26% contenant les mitochondries est récupérée, diluée dans 4 volumes de tampon de resuspension très lentement, pour ne pas soumettre les mitochondries à un choc osmotique. La solution enrichie de mitochondries est alors centrifugée à 15 000 g pendant 10 minutes. Le culot contenant les mitochondries est alors resuspendu dans 40 µl de tampon de resuspension pour la synthèse *in organello*.

Tampon de Broyage:

Mannitol	0,3 M
MOPS	50 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
EGTA	1 mM
cystéine	20 mM
BSA	1% p/v
Polyclar (PVP insoluble)	0,1% p/v

Le pH est ajusté à 7,6 avec du KOH 1N.

La solution est stérilisée par filtration sur filtre Millipore 0,2 µm.

Tampon de resuspension:

Mannitol	0,3 M
KH ₂ PO ₄	10 mM
BSA	0,5% p/v

Le pH est ajusté à 7,4 avec KOH 1N.

La solution est stérilisée par filtration sur filtre Millipore 0,2 µm.

Solution de Percoll à 0%

saccharose	0,3M
MOPS pH 7,2	10 mM
EDTA	1 mM
BSA	0,2% p/v

Solution de Percoll à 45%

saccharose	0,3 M
MOPS pH 7,2	10 mM
EDTA	1 mM
BSA	0,2% p/v
Percoll	45% v/v

Les solutions à 26% et 13% sont réalisées en mélangeant les 2 solutions à 0% et 45% de Percoll dans les proportions adéquates.

2.2.3.2.Synthèse *in organello*

Juste après l'extraction des mitochondries, la synthèse *in organello* est réalisée en ajoutant à la suspension fraîche de mitochondries, 100µl de milieu de synthèse, 1 µl d'érythromycine (40 mg/ml dissoute dans l'éthanol) et 3 µl de Méthionine marquée au ³⁵S (³⁵S Methionine *in vivo* cell labelling, activité spécifique supérieure à 1000 Ci/mmol, Dupont). L'ensemble est incubé, pendant 1 heure 30 minutes à 25°C, dans un tube falcon de 14 ml sous agitation douce pour permettre une oxygénation du milieu de synthèse. La

synthèse est arrêtée par l'addition de 500 µl de solution stop contenant de la méthionine froide. Les synthèses sont centrifugées 5 minutes à 15 000 g. Le culot de mitochondries, contenant les protéines marquées néosynthétisées, est lysé par addition de 100 µl de tampon de lyse. Les protéines contenues dans le surnageant sont ensuite précipitées par 9 volumes d'acétone pendant la nuit à -20°C. Les protéines, récupérées après centrifugation pendant 30 minutes à 15 000 g, sont séchées puis resuspendues dans 30 µl de tampon de Laemmli. Les protéines peuvent alors être stockées à ce stade à -20°C jusqu'au moment où elles seront séparées par électrophorèse.

Milieu de synthèse:

KH ₂ PO ₄	5 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	60 mM
DTT	2 mM
GTP	2 mM
ADP	4 mM
Malate	10 mM
Pyruvate	1 mM
Hepes	50 mM
Mannitol	0,4 M
BSA	0,1% p/v
19 acides aminés	25 µM chaque
pH 7,0 ajusté avec KOH	

Milieu stérilisé par filtration sur filtre Millipore 0,2 µm, aliquoté et conservé à -80°C pendant 2 mois maximum.

19 acides aminés : alanine, asparagine, valine, glutamine, glutamate, leucine, isoleucine, aspartate, proline, lysine, phénylalanine, arginine, tryptophane, histidine, glycine, sérine, thréonine, cystéine, tyrosine.

Solution "stop":

Saccharose	0,4 M
------------	-------

Méthionine 12 mM

KH₂PO₄ 10 mM

pH ajusté à 7,0 avec KOH

Solution filtrée sur filtre Millipore 0,2 µm, stockée à -20°C

Tampon de lyse:

Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM

SDS 2% p/v

Glycérol 10% p/v

β-mercaptoéthanol 5% v/v

Tampon aliquoté et conservé à -20°C

Tampon de charge Laemmli:

Tris-HCl 62 mM

SDS 2% p/v

β-mercaptoéthanol 5% v/v

Glycérol 10% v/v

Bleu de bromophénol 0,5% v/v

**2.2.3.3.Séparation des protéines en conditions
dénaturantes**

Les protéines, resuspendues dans le tampon de charge Laemmli, sont dénaturées pendant 5 minutes à 100°C. L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide-SDS. Le gel est constitué d'un premier gel de concentration à 4% d'acrylamide et d'un gel de séparation à 12,5% d'acrylamide. Une échelle de poids moléculaires, marquée au ¹⁴C est également déposée (Rainbow™ markers, Amersham). La migration s'effectue à 350 V dans le gel de concentration puis à 200V quand les échantillons protéiques ont atteint le gel de séparation. Lorsque la migration est terminée, le gel est coloré pendant une nuit au bleu de Coomassie. Il est ensuite décoloré par passages successifs dans 3 mélanges d'éthanol et d'acide acétique (2 passages de 30 minutes dans chaque solution de décoloration). Après la décoloration, le gel est placé dans un bain d'Amplify (Amersham)

pendant 20 minutes. Le gel est ensuite séché sous vide puis exposé pendant un mois à un film autoradiographique (βmax Amersham).

Gel de concentration à 4% :

Acrylamide 30%, bis-acrylamide 0,8%	162,5 µl
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	312,5 µl
H ₂ O	762,5 µl
SDS 10%	12,5 µl
APS 10%	6,25 µl
TEMED	1,25 µl

Gel de séparation à 12,5 % :

Acrylamide 30%, bis-acrylamide 0,8%	2,5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,5 µl
H ₂ O	1,9 ml
SDS 10%	60 µl
APS 10%	30 µl
TEMED	3 µl

Tampon d'électrophorèse 10x:

Tris-HCl	30,3 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	qsp 1 l

Solution de Bleu de Coomassie à 12% :

Bleu de Coomassie	0,25 g
éthanol 95%	100 ml
acide acétique 24% v/v	100 ml

Solution de décoloration:

Solution 1 : 100 ml d'éthanol 95% + 150 ml d'acide acétique 5% v/v

solution 2 : 75 ml d'éthanol 95% + 175 ml d'acide acétique 5% v/v

solution 3 : 50 ml d'éthanol 95% + 200 ml d'acide acétique 5% v/v

Résultats : Chapitre I

Stabilisation des morphologies florales et des génomes mitochondriaux dans les cybrides 411, 523 et 524.

3. Résultats

3.1. Article 1

ANALYSES OF MITOCHONDRIAL SEGREGATION AND MITOCHONDRIAL
STABILISATION IN THREE CYTOPLASMIC MALE STERILE CHICORIES ORIGINATING
FROM SOMATIC HYBRIDIZATIONS.

Anne Dubreucq, Blandine Berthe, Lionel Boulidard², Jacques Vasseur and Caroline Rambaud¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse végétales. USTL/ INRA. Université des Sciences et Technologies de Lille. Bâtiment SN2. 59655 Villeneuve d'Ascq.

²Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

¹For correspondence
Caroline Rambaud

USTL, Bâtiment SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex
Tel. : 03 20 43 66 78
Fax: 03 20 33 60 44

Abstract: Cytoplasmic male sterile chicories were previously obtained by somatic hybridisation between fertile industrial chicory protoplasts and CMS sunflower protoplasts. In this study, we compared three different CMS chicory cybrids, originating from three different fusion events, backcrossed with different witloof chicories in order to transfer the three male-sterile cytoplasms from an industrial chicory nuclear context to a witloof chicory nuclear context. Southern hybridisation using different mitochondrial genes as probes, revealed that the three cybrid mitochondrial genomes were different, that they were in the process of stabilising regardless of the pollinator used for backcrosses, despite of a light instability still remaining. However pollinators were found to influence floral morphologies. One particular pollinator seems to restore fertility because it induces flowers with blue anthers presenting pollen. In this particular nuclear context selfpollinations can be achieved.

KEY WORDS: somatic hybrids - *Cichorium intybus* L. - *Helianthus annuus* L. -mitochondrial segregation - cytoplasmic male sterility

Introduction.

In higher plants, mitochondria contain different physical forms of mitochondrial DNA (mtDNA), which are in a dynamic equilibrium. This complicated structure explains the complexity of the restriction patterns generally obtained. The various forms arise through DNA recombinations across numerous active repeats, found in the mitochondrial genome, except for *Brassica hirta* (Palmer and Herbon, 1987). The repeats often contain genes. In addition, short repeats are found in non coding regions and are thought to take part in the genomic reorganisation during evolution.

Cytoplasmic male sterility (CMS) is a maternally inherited phenotype in which plants are unable to produce functional pollen. CMS can appear spontaneously, or be induced by inter or intraspecific crosses, resulting in new nuclear-mitochondrial interactions. Finally it can originate from protoplast fusions leading to recombinations between the two parental mitochondrial genomes. After somatic hybridisation, the resulting cell, a heterokaryocyte, consists of a mixture of cytoplasms containing both types of chloroplasts, mitochondria and nuclei. The most frequent cell situation, resulting from heterokaryocyte mitosis and wall formation, is the random distribution of mixed cytoplasms and reindividualized parental nuclei in each resulting daughter cell. Those cells are called cybrids (Pelletier and Chupeau, 1984). Molecular evidences, using restriction analysis of some cybrid mtDNAs, have suggested that recombinations may occur between parental mtDNAs prior to cytoplasmic segregation in somatic hybrids (Evans *et al.*, 1983). It has been suggested that the intergenomic recombinations might be limited to certain repeated sequences (Clarck *et al.*, 1986; Kemble *et al.*, 1986; Kothari *et al.* 1986, Landgren *et al.*, 1994 a; Landgren *et al.*, 1994 b). Several parameters could influence mitochondrial segregation: phylogenetic distance between the two partners fused, differences in replication rates as well as protoplast origin (Landgren *et al.*, 1990; Landgren and Glimelius, 1994 a; Landgren *et al.*, 1994 b).

A few CMS systems have become models for fundamental research into the processes leading to pollen abortion. CMS studies on maize (Levings, 1993), petunia (Connett and Hanson, 1994), sunflower (Laver *et al.*, 1991) and *Brassica* (Bonhomme *et al.*, 1991) have shown differences between fertile and CMS plants at the mitochondrial level. Based on comparisons between CMS, fertile and/or restored plants, CMS was found to be associated with mtDNA regions containing open reading frames (*orf*) transcribed and translated into novel CMS associated proteins. DNA rearrangements can result in the production of chimeric genes by the fusion of several coding sequences in the same reading frame (Bonen and Brown, 1993). The studies on sunflower CMS reveal the existence of a novel open reading frame, *orf522*, detected in male sterile and restored sunflowers but absent in fertile sunflower. This *orf* could originate from recombinations through a 265 bp repeat found in the sunflower mtDNA (Laver *et al.*, 1991, Köhler *et al.*, 1991). The *orf522*, located downstream of the *atpA* gene, is cotranscribed with it. By *in organello* translation

experiments, a 15 kDa polypeptide has been detected specifically in CMS plants, regardless of the explant used. The *orf522* product has been identified as being the 15 kDa polypeptide. As it is present in reduced level in male florets of restored sunflower, it has been suggested that the 15 kDa protein is responsible for CMS phenotype in sunflower (Monéger *et al.*, 1994).

The study of the restoration mechanism, under the influence of nuclear genes, points out the influence of the nuclear genome on the mitochondrial functioning. CMS has become a very useful tool for hybrid production because male sterile plants are unable to perform selfpollination and thus avoid manual castration. In addition to agronomic applications, the CMS offers a good material for fundamental studies on mitochondria and nuclear-mitochondrial interactions because it offers a rare case of mitochondrial-variants presenting an easily observable phenotype.

In *Cichorium intybus* L., only “nuclear“ male-sterile plants have been observed, i. e. inherited according to Mendelian laws. Somatic hybridisation by protoplast fusion is a good way to induce mitochondrial modifications. Because CMS is usually associated with mtDNA modifications, Rambaud *et al.* (1993) performed protoplast fusions between fertile industrial chicory protoplasts (*Cichorium intybus* L. cv. Magdebourg) and CMS sunflower protoplasts (*Helianthus annuus* cv. Mirasol), aiming to induce or to transfer CMS in chicory and thus obtain male sterile chicories. Sunflower protoplasts were used because they were phylogenetically far enough from chicory to prevent nucleus fusion but close enough to allow rearrangements between chicory and sunflower mitochondrial genomes. Among all the plants regenerated, from independent fusion events, 16 were male-sterile presenting different floral morphologies. The 524 and 411 cybrids were characterised by a total lack of anthers. The 523 cybrid was characterised by non dehiscent brown anthers without pollen or with non viable pollen. These 3 cybrids were backcrossed and the maternal heredity of the male sterility revealed the nucleo-cytoplasmic nature of this male sterility (Rambaud *et al.*, 1993). Preliminary molecular analyses, made on 411 and 523 cybrids, revealed modifications at the mitochondrial genome level. The CMS chicories presented certain sequences characteristic of sunflower, certain new sequences and had lost certain sequences characteristic of fertile chicory (Rambaud *et al.*, 1993). Studies, made on the 411 fourth progeny, in an industrial chicory nuclear context, revealed that the mitochondrial genome presented polymorphism as siblings exhibited different profiles, but conserved the *orf522* sunflower specific sequence introduced in the chicory mitochondrial genome after protoplast fusion (Rambaud *et al.*, 1997).

In this paper, we report the results of molecular investigations on mtDNA from three different cytoplasmic male sterile cybrids, with the 411, 523 and 524 cytoplasms respectively. They were backcrossed into witloof chicory to transfer the male-sterile cytoplasm from an industrial chicory nuclear context to a witloof chicory nuclear context.

Because these three cytoplasms originate from three different fusion events, we wanted to know whether they were identical or not. This question was addressed from the findings, in literature, of

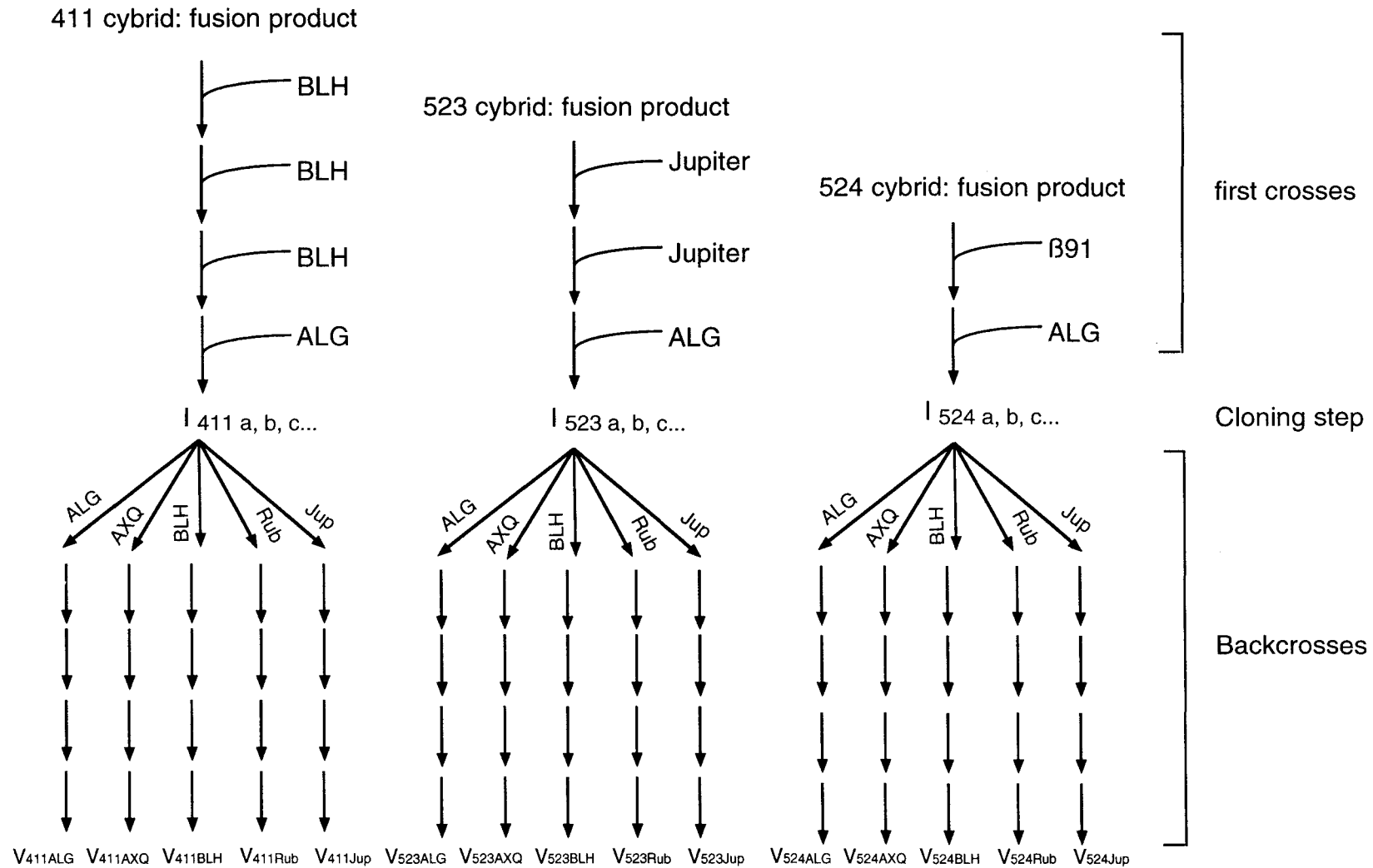


table 1: Three protoplast fusion products were at the origin of three different CMS plants presenting either the 411, 523 or 524 cytoplasm.

Those three CMS plants were first crossed differently. They were then cloned (l₄₁₁, l₅₂₃, l₅₂₄) to give a, b, c....plants in the three different cytoplasms analysed in RFLP. The plants chosen for the cloning step were then backcrossed during five generations with different pollinators (ALG, AXQ, BLH, Rub, Jupiter). After five generations of backcrossing, siblings, in each cytoplasm context and backcrossed with different pollinators were analysed in RFLP.

identical rearrangements in somatic hybrids. Because a mitochondrial instability was observed in the 411 cybrid fourth progeny, we wanted to know if the 411 cytoplasm would stabilised after more generations of backcrosses, if the 523 and 524 cytoplasms would also exhibit stable profiles and if the three cytoplasms would share common features since the parameters susceptible of influencing mitochondrial segregation were identical for the three cytoplasms studied. We also wanted to know whether the stabilisation would depend on the pollinator used for backcrossing, that is to say, analyse the nuclear influence on mitochondrial segregation and or recombinations. Analyses of floral morphology in different nuclear contexts could, as well, inform us on nuclear influences on the mitochondrial genome expression.

Materials and methods

Plant materials

For each cytoplasm studied, one plant without anthers was chosen to be cloned by *in vitro* culture. These plants had already been crossed with different endivia chicory lines used as the male parent (ALG, BLH, Jupiter and B91) (table 1). The chosen plant, exhibiting a 411 cytoplasm (I_{411}) had already been crossed over three generations with a witloof chicory presenting the BLH nucleus and then once with an ALG pollinator. The chosen plant, exhibiting a 523 cytoplasm (I_{523}) had already been crossed twice with a Jupiter witloof chicory and once with an ALG pollinator. The plant exhibiting a 524 cytoplasm (I_{524}) had already been crossed once with a witloof chicory presenting the B91 nucleus and then once with the ALG pollinator. The three clones constituted the first series studied ($I_{411\ a, b, c...}$, $I_{523\ a, b, c...}$, $I_{524\ a, b, c...}$) (table 1).

Those three plants were also backcrossed over five generations with different witloof chicories presenting either ALG, AXQ, Jupiter, Rub or BLH nucleus to transfer progressively those cytoplasms from an industrial nuclear context to a witloof nuclear context. For each cytoplasm and each different nuclear context, siblings were studied. These plants constituted the last generation analysed ($V_{411\ \alpha, \beta, \gamma...}$, $V_{523\ \alpha, \beta, \gamma...}$, $V_{524\ \alpha, \beta, \gamma...}$) (Table 1).

C. intybus L. cv. Pévèle and *Helianthus annuus* cv. Mirasol (CMS line) (provided by Ets. Florimond-Desprez), the two species used for the fusions and the pollinators used for backcrosses, ALG, AXQ, BLH, Rub, Jupiter (provided by INRA, Versailles) were used as controls.

Methods

In vitro culture. For each cloned plant, leaf explants were surface sterilised in calcium hypochloride (10 g/l) and washed 3 times in sterile distilled water. They were then placed on Petri dishes on a

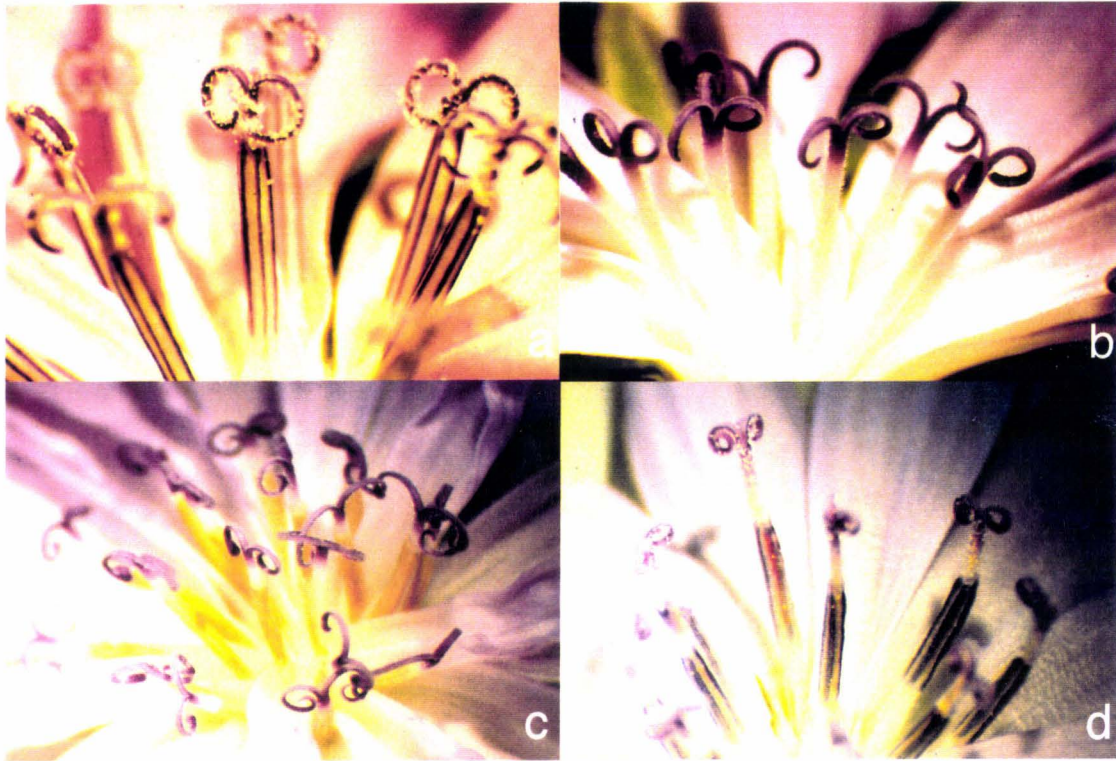


Fig. 1 a-d: Different floral morphologies of 411, 523, 524 cybrid lines backcrossed with different pollinators.

a: ALG chicory with normal blue anthers and pollen.

b: Flower without anther observable when CMS chicories are backcrossed with ALG, AXQ and Rub pollinators.

c: Flower with brown anthers without pollen observable when CMS chicories are backcrossed with BLH pollinators.

d: Flower with nearly normal fertile morphology, blue anthers with less pollen compared to normal fertile pollinator, observable when CMS chicories are backcrossed with Jupiter pollinator.

gelified medium for callus proliferation (Rambaud *et al.*, 1993). The calli were transferred on a MS (Murashige and Skoog, 1962) medium, containing agar (5 g/l), major salts, Fe-EDTA at half-strength (19.5 mg/l), sucrose (5 g/l), benzyladenine (0.1 mg/l) and Morel and Wetmore (1951) vitamins. After buds appeared, roots were induced by transferring them on a Heller (1953) medium supplemented with MS Fe-EDTA at half strength and sucrose (10 g/l). During the *in vitro* culture, explants were cultivated at 24°C-20°C, with a light-dark cycle of 16 h : 8 h. The plantlets were then transferred into a greenhouse to produce leaves which were used for total DNA extraction.

DNA isolation. Total DNA was extracted from chicory leaves and from 10-day old dark grown "Mirasol" sunflower seedlings (according to Dellaporta *et al.*, 1983).

Southern blot analyses. Total DNA (10 µg from each sample) was digested with restriction endonucleases (*EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* and *HindIII*, Appligène), separated by agarose (0,8 %) gel electrophoresis in 1 x TAE buffer (40 mM Tris, 2 mM EDTA4Na) and blotted to nylon membrane (Hybond N, Amersham) by vacuum blotting (Vacugene XL) according to the manufacturer's instructions (Pharmacia Biotech). After blotting, membranes were baked at 80°C for two hours. Hybridisation was performed overnight at 42°C in 50 % formamide, 0,2 % (w/v) SDS, 1x Denhardt's solution (2 % BSA (w/v), 2 % PVP (w/v), 2 % ficoll 400 (w/v)), 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.375 M trisodium citrate pH 7), 20 mM NaH₂PO₄ /Na₂HPO₄ and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Mitochondrial probes were radiolabelled by random priming using the T7 Quick Prime kit (Pharmacia) and then purified on a G50 Sephadex column (Pharmacia). Washes were performed at 45°C in 6 x SSC-0.1 % SDS (w/v) for 10 min., 2 x SSC-0.1 % SDS (w/v) for 15 min and 0,2 x SSC-0.1 % SDS(w/v) for 30 min. The membranes were then autoradiographed using Hyperfilm-MP Amersham, at -80 °C with an intensifying screen. Before the next hybridisation, membranes were stripped in 0.1 % (w/v) boiling SDS.

Mitochondrial gene probes. The *coxI* probe, corresponding to the maize *coxI* gene, was kindly provided by C.J. Leaver. The *coxII*, *coxIII*, *atpA*, *atp6*, *atp9*, *cob*, *rrn18* and *rrn26* probes, corresponding to the maize genes, were kindly provided by W. Hauswirth (Muisse *et al.*, 1992; McCarty *et al.*, 1988).

CoxI probe, a 3.95 kb *EcoRI*-*BamHI* fragment cloned in pAT153, was prepared by plasmidic extraction. The other probes used were prepared by PCR amplification on mitochondrial gene containing plasmids, using the universal primers pTAg forward and reverse. An hybridisation with the empty vector was done as control to make sure that no hybridisation signal due to the vector borders could be detected.

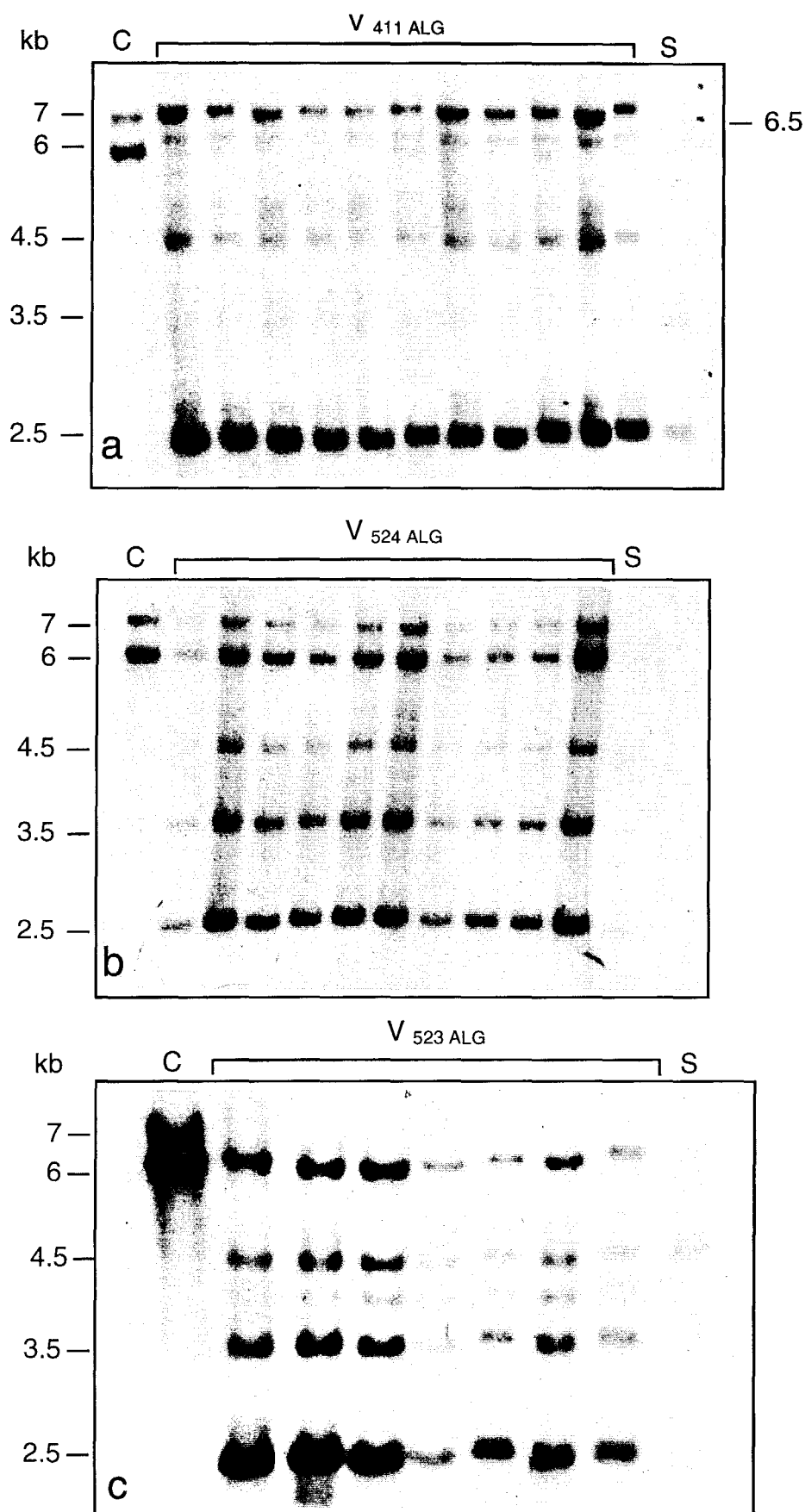


Fig. 2 a-c: Southern blot analysis of total DNAs digested by *Eco*RI from the parental species (chicory, C; sunflower, S) and the CMS chicories backcrossed during five generations with the ALG pollinator with mitochondrial *coxII* probe.

a: V 411 ALG siblings coming from 411 cybrid.

b: V 524 ALG siblings coming from 524 cybrid.

c: V 523 ALG siblings coming from 523 cybrid ; fragment sizes are given in kb.

Results

Flower morphology

Male sterile chicories were obtained by protoplast fusions between fertile chicory protoplasts and CMS sunflower protoplasts.

In the first crosses, floral morphological segregation was observed. Each plant chosen for the cloning step, in our analyses, exhibited antherless flowers. Because of the instability of the 411 cytoplasm and the floral segregation observed after the first crosses, flowering of each cybrid clone was observed to ensure that the cloned plants analysed were male sterile. The plants for clone 411 ($I_{411\text{ a, b, c...}}$) presented either antherless flowers or flowers with rudimentary anthers. The plants for clone 524 ($I_{524\text{ a, b, c...}}$) presented completely antherless flowers. The plants from clone 523 ($I_{523\text{ a, b, c...}}$) presented either antherless flowers or flowers with brown anthers. Moreover, in addition to the variability noticed at the anther level, some 523 plants presented very short triphide stigmates.

When the fifth generation siblings were observed, the floral morphologies were different according to the pollinator used for the backcrosses but identical between siblings. Floral morphologies seemed to depend only on the pollinator used regardless of the cybrid observed. When each of the 3 cybrids were backcrossed with AXQ, Rub and ALG, identical flowers without anthers were observed (fig. 1b). When the cybrids were backcrossed with BLH, flowers with brown anthers were observed (fig. 1c). When V_{411} , V_{523} or V_{524} antherless plants were backcrossed with Jupiter, the progeny exhibited a brown-anther flower morphology. After the second backcross, with Jupiter, the flower morphology reverted to normal blue anthers with pollen for the three cybrids. In this case, male fertility was restored as those plants could undergo self-pollination (fig. 1d). It was concluded that the pollinators used for backcrossing influence the floral morphologies. This result shows that the nuclear contexts used for backcrosses do influence the phenotype. Even though Jupiter seems to restore male fertility in the three cybrids, there was no indication that the 411, 523, 524 cytotypes were identical or not. Despite this question, we wanted to determine whether the nuclear genome would influence the structural evolution of the mitochondrial genomes, and if this was the case, whether this influence would be the same for the three mitochondrial genomes.

Analyses of the mtDNA

Previous studies made on plants originating from protoplast fusions have shown that mitochondrial genome rearrangements (Rambaud *et al.*, 1993). Analyses, using different mitochondrial probes, showed that these male-sterile cybrids presented either an RFLP profile typical of fertile chicory, or hybrid profiles combining the profiles of fertile chicory, sterile sunflower with other new bands. Studies on 411 cybrid progenies (Rambaud *et al.*, 1997) confirmed mitochondrial rearrangements.

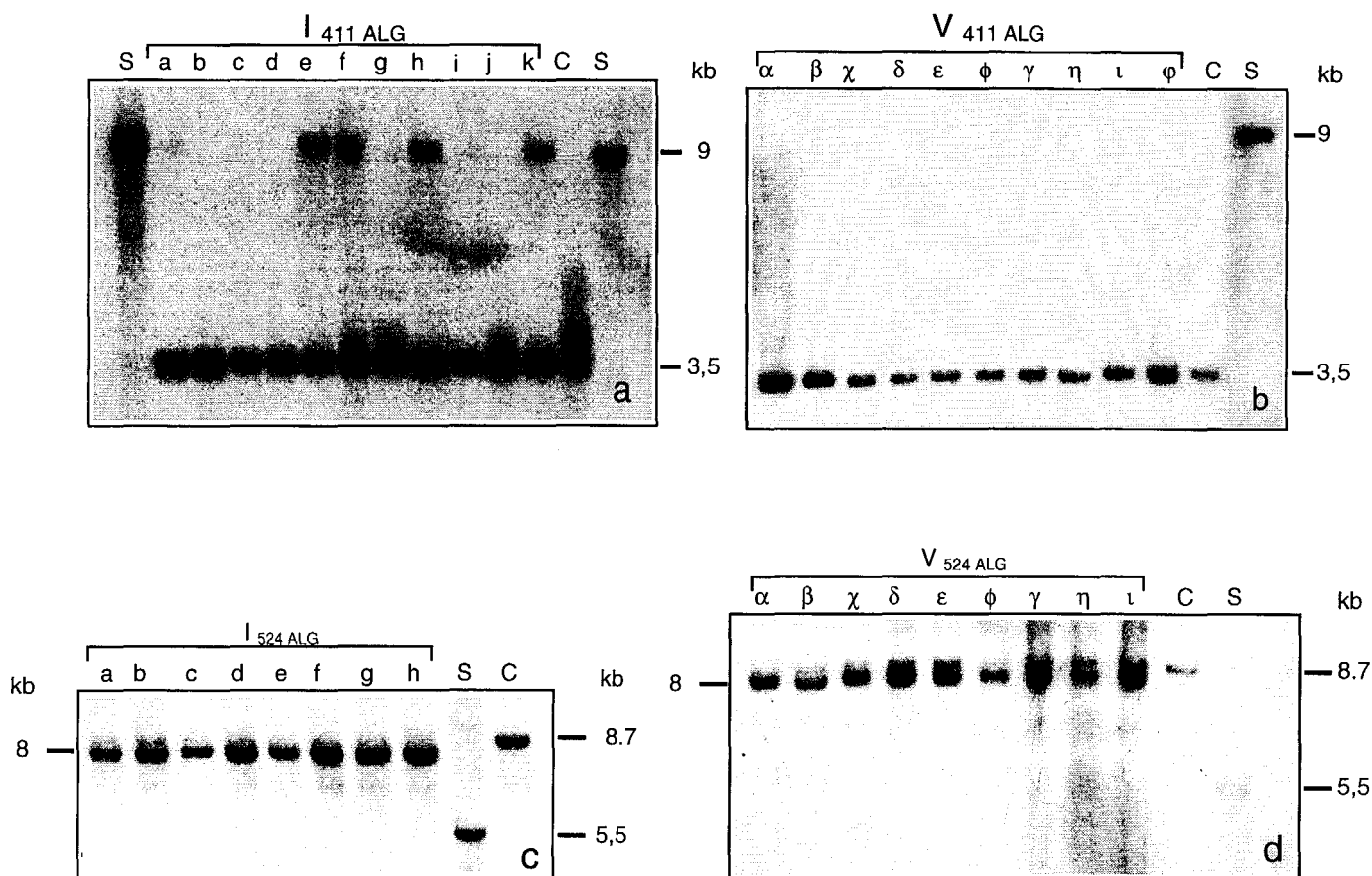


Fig. 3 a-d: Southern blot analysis of total DNAs from the parental species (chicory, C; sunflower, S) and the CMS chicories with mitochondrial *atpA* probe.

a: total DNAs digested by *Hind*III. $I_{411} \text{ ALG}$ a to k: 11 plants coming from the 411 cybrid after the cloning step.

b: total DNAs digested by *Hind*III. $V_{411} \text{ ALG}$ α to φ : 10 siblings coming from the 411 cybrid.

c: total DNAs digested by *Eco*RV. $I_{524} \text{ ALG}$ a to h: 8 plants coming from the 524-cybrid after the cloning step.

d: total DNAs digested by *Eco*RV. $V_{524} \text{ ALG}$ α to ι : 10 siblings coming from the 524 cybrid; fragment sizes are given in kb.

After protoplast fusions, a few cybrids were compared and revealed that they were different from each others, but the three cytotypes, 411, 523, 524, were not compared at that time. Thus a RFLP analysis was performed to determine whether the cytotypes were identical or not and whether they exhibited parental fragments (identical to fertile chicory or CMS sunflower) and/or new fragments originating from recombination events. The *coxI* and *atp9* probes did not show any difference between the CMS cybrids and the fertile chicory (data not shown). The same RFLP analysis was made on V₄₁₁ ALG, V₅₂₃ ALG, V₅₂₄ ALG siblings after *EcoRI* digestion and hybridisation with the *coxII* probe (fig. 2a, b, c). All the plants analysed exhibited the 2.5 kb sterile sunflower fragment. The V₅₂₃ ALG and V₅₂₄ ALG also presented the 6 kb fertile chicory fragment but not the V₄₁₁ ALG. The 7 kb fragment observable in V₄₁₁ ALG and V₅₂₄ ALG siblings was absent in V₅₂₃ ALG. On the contrary, a 3.5 kb fragment, observable in the V₅₂₃ ALG and V₅₂₄ ALG siblings, was absent in the V₄₁₁ ALG. Moreover V₄₁₁ ALG showed stoichiometric differences for certain fragments when compared to fertile chicory profile. In fig. 2a, the 7 kb fertile chicory fragment shows a stronger signal in the 411 cybrid plants when compared to the signal observed for fertile chicory. On the contrary, the new 6.5 kb fragment, observed in 411 cybrids, show a very weak signal. Several *coxII* genes, presenting a *EcoRI* restriction site in their sequence, can exist in the mitochondrial genome. Differences in the location of other *EcoRI* sites could explain the stoichiometric differences observed by relative variations in the representation of certain fragments. These results showed that the mitochondrial genome had undergone recombination events, because the cybrid profiles were different from the parental ones, and that each cybrid was different from the two others in the mitochondrial *coxII* region.

Previous studies showed polymorphism of the *atpA* region inside progeny of the 411 cybrid (Rambaud *et al.*, 1997). Such polymorphism was interpreted as an instability of the mitochondrial genome of this family. We analysed this region during the backcrosses of the present study. In addition, our analyses made on the clone 411 (I_{411 a, b, c...}) pointed out this instability. When total DNA of the I₄₁₁ ALG plants was digested by *HindIII* and hybridised with *atpA* probe (fig. 3 a), all plants tested hybridised the 3.5 kb fertile chicory fragment, but 4 out of 11 tested plants exhibited the 9 kb male-sterile sunflower fragment as well. This result suggested that the 411 cybrid, originating from protoplast fusion, had received, in addition to the *atpA* chicory gene, the sunflower *atpA* gene. A second hybridisation with the same probe was done, after *EcoRV* digestions. All the I₄₁₁ ALG plants tested presented the 8.7 kb fertile chicory fragment, but the 4 plants, presenting the sunflower *atpA* fragment after *HindIII* digestion, presented as well a new 6.8 kb fragment, different from the parental hybridisation fragments (data not shown). This result showed that the *atpA* sunflower fragment, introduced into chicories during fusion, had undergone modifications. The polymorphism observed suggested that the 411 cybrids were on the way to lose the *atpA* sunflower gene. This hypothesis was confirmed by a similar analysis on the 411 siblings V₄₁₁ ALG (fig. 3 b).

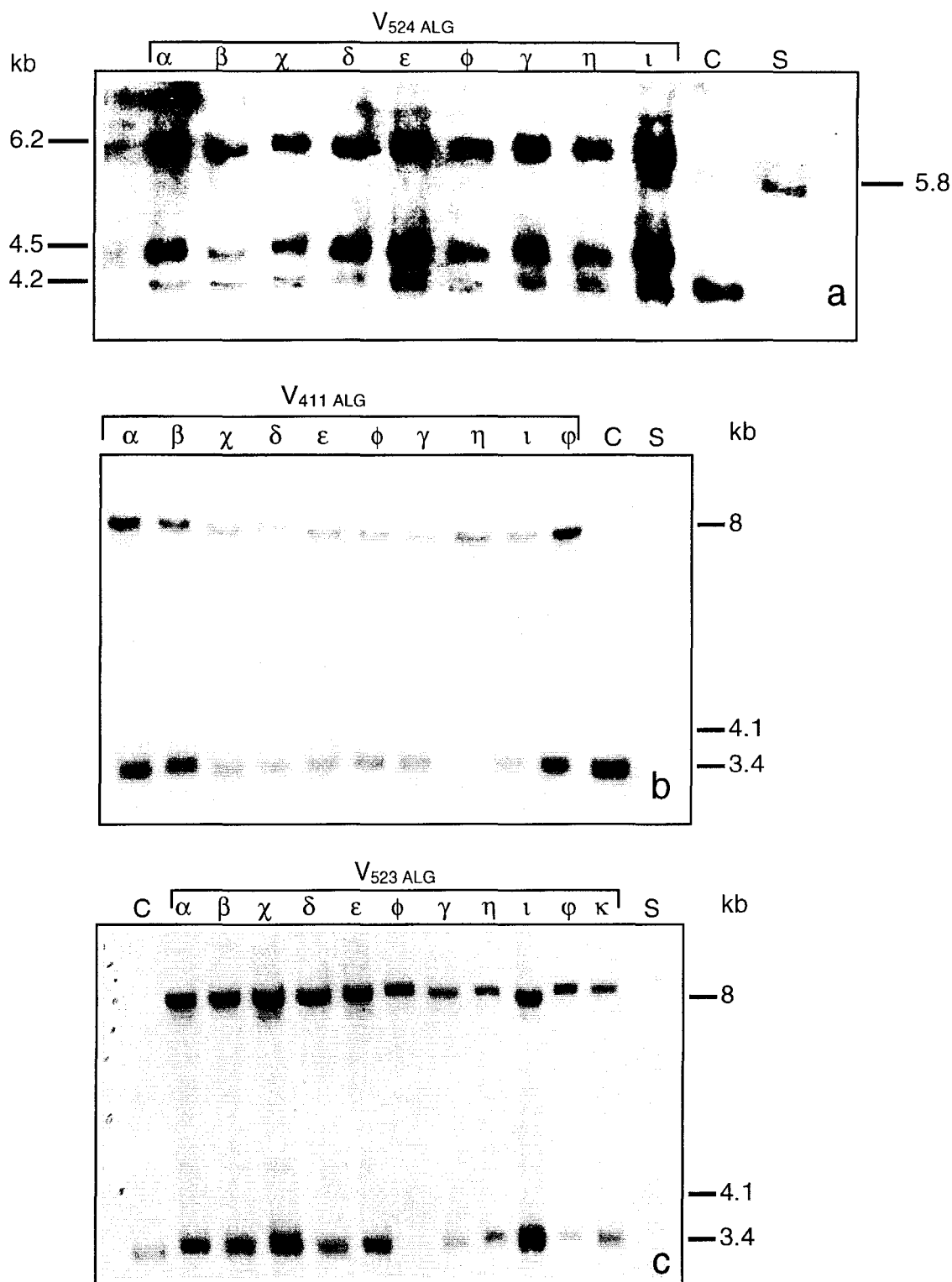


Fig. 4 a-c: Southern blot analysis of total DNAs from the parental species (chicory, C; sunflower, S) and the CMS chicories with mitochondrial *cob* probe. a: total DNAs digested by *EcoRV*. V_{524} ALG α to ι : 10 siblings originating from the 524-cybrid plant. b: total DNAs digested by *HindIII*. V_{411} ALG α to ϕ : 10 siblings coming from the 411 cybrid plant. The “ η ” plant does not exhibit the 3.4 kb fragment. c: total DNAs digested by *HindIII*. V_{523} ALG α to κ : 11 siblings coming from the 523 cybrid plant. The “ ϕ ” plant does not exhibit the 3.4 kb fragment; fragment sizes are given in kb.

All the tested plants presented only the 3.5 kb fertile chicory fragment, confirming the loss of the sunflower *atpA* gene and mitochondrial genome stabilisation in the *atpA* gene region.

When total DNA was digested by *EcoRV* and hybridised with the *atpA* probe, all the plants originating from cybrid 524, either I_{524} or $V_{524\text{ ALG}}$, presented a new 8 kb fragment (fig. 3 c, d).

This fragment was different from the 5.5 kb fragment observed for the male-sterile sunflower and from the 8.7 kb fragment observed for the fertile chicory. Unlike the 411 cybrids, for 524 cybrids, the *atpA* CMS sunflower fragment was never observed. In the 523 cybrid family, all the plants tested, either I_{523} or $V_{523\text{ ALG}}$, presented typical fertile chicory profiles when total DNAs were digested by different restriction enzymes (*EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* and *HindIII*) and hybridised with *atpA* probe (data not shown). From this result, we concluded that, following protoplast fusions, the 523 cybrid could only have integrated into its mitochondrial genome the fertile chicory *atpA* gene.

Concerning the plants $I_{411\text{ a, b, c...}}$ presenting mitochondrial polymorphism, no correlation could be made between a particular mitochondrial profile and a particular floral morphology.

Previous study showed that, immediately after fusion, a large part of the sunflower mitochondrial genome, including the *cob*, *coxII*, *coxIII*, *atpA*, *atp6*, *rrn18-5* genes, had been incorporated into the 411 cybrid (Rambaud *et al.*, 1993). We wanted to know if this sunflower part was maintained through generations in the "411" cytoplasm. We wanted to determine whether the sunflower mitochondrial genome part incorporated into the two other cytoplasms was identical and whether the standardisation of the mitochondrial patterns observed in the *atpA* gene vicinity could be generalised to all the mitochondrial structure.

To address this question, RFLP analyses were performed using other mitochondrial gene probes such as *atp6*, *atp9*, *coxI*, *coxIII*, *cob*, *rrn18* and *rrn26*. When total DNA from 524 sibling plants ($V_{524\text{ ALG}}$) were digested by *EcoRV* and hybridised with *cob*, all the plants presented the 4.2 kb fertile chicory fragment and two new fragments of 4.5 kb and 6.2 kb, whereas the 5.8 kb sunflower fragment was absent (fig. 4 a). The $V_{524\text{ ALG}}$ presented one fertile chicory fragment and two recombination fragments. When total DNA from 411 and 523 siblings plants ($V_{411\text{ ALG}}$, $V_{523\text{ ALG}}$) were digested by *HindIII* and hybridised with *cob*, a large majority of the plants tested presented the same profile. Nevertheless, one plant in each cytotype ($V_{411\text{ ALG } \eta}$, $V_{523\text{ ALG } \phi}$) was different from the others because they exhibited only a new 8 kb fragment. The other plants tested presented the 3.4 kb fertile chicory fragment and the new 8 kb fragment (fig. 4 b, fig. 4 c).

This result showed that 411 and 523 cybrids still exhibited a light heterogeneity in the vicinity of the mitochondrial *cob* gene when homogeneity had been reached in the *atpA* region. The only other observable heterogeneity on Southern blots was due to signal intensity of very weak bands and this was very difficult to interpret.

Other RFLP analyses (data not shown) made on other mitochondrial genes revealed that the three cybrids presented recombined profiles in the *atp6*, *cob*, *rrn18* and *rrn26* regions. Although

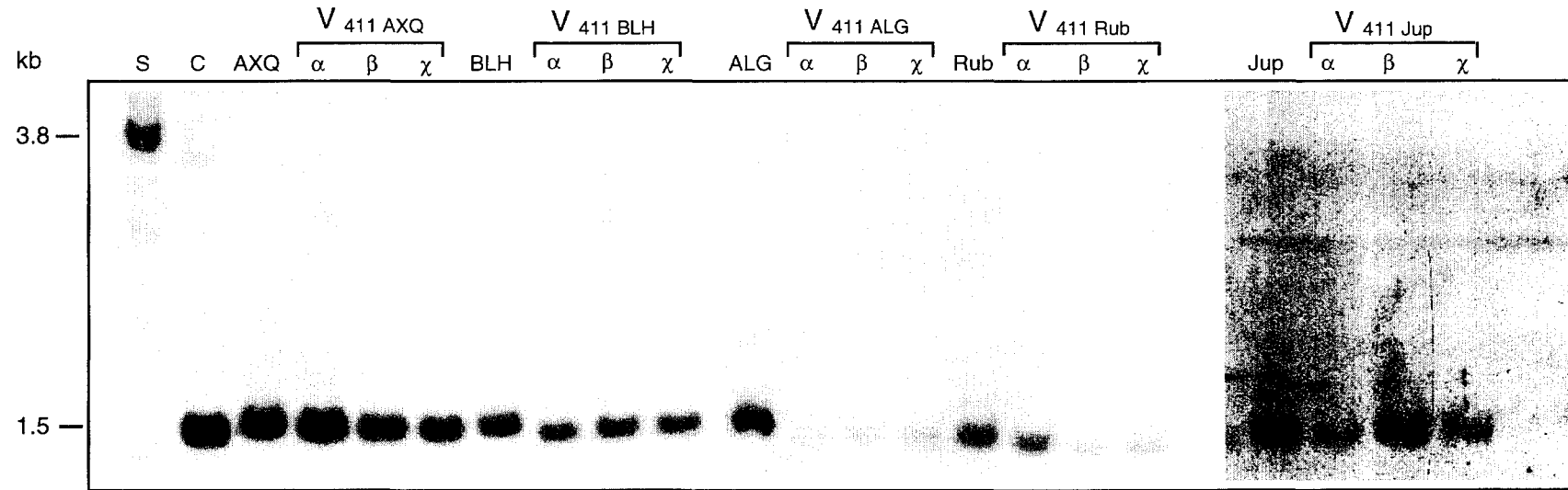


Fig. 5: Southern blot analysis of total DNAs digested by *Eco*RI from the parental species (chicory, C; sunflower, S) and the 411 CMS chicories backcrossed with five different pollinators (ALG, AXQ, BLH, Rub, Jupiter (Jup)) during five generations using *atpA* as probe. For the five pollinators used for backcrossing, 3 siblings (V₄₁₁ AXQ α to β, V₄₁₁ BLH α to χ, V₄₁₁ ALG α to χ, V₄₁₁ Rub α to χ, V₄₁₁ Jup α to χ) are analysed in each nuclear context; fragment sizes are given in kb.

sunflower *coxIII* seemed to have been incorporated in the first cybrids analysed (Rambaud *et al.*, 1993), 411, 523 and 524 cybrids display patterns typical of fertile chicory for this gene. Taken together, our observations argue in favour of a standardisation in the mtDNA structure of each cybrid. For certain mitochondrial regions, the profiles observed are different when the three cybrids are compared. We obtained some evidence that a part of this standardisation was due to the loss of some sequences present in the original cybrid (such as the sunflower *atpA* region in cybrid 411). As the nuclear genome is known to influence mitochondrial rearrangements and structure, we wanted to know if the patterns obtained in the ALG nuclear background would be identical when other pollinators had been used for backcrosses.

To determine whether the nucleus had any interaction on the mitochondrial genome stabilisation, an RFLP analysis (using seven different mitochondrial sequences as probe) was made. Total DNA from each cybrid, backcrossed with different pollinators (ALG, AXQ, BLH, Rub and Jupiter), was digested by the same restriction enzyme and hybridised with the same probe. All the CMS chicories tested exhibited the same profile in each cytoplasm context regardless of the pollinator used for backcrosses as shown in fig. 5 for the 411 cybrids and the *atpA* probe. Moreover, we compared the mitochondrial profiles obtained for the different witloof pollinators (with 7 different probes), and they exhibited profiles identical to industrial chicory profiles.

The three cytotypes studied in this work carry different mitochondrial genomes, which were slowly established and/or stabilised during backcross generations independently of the pollinator used. However, we observed an influence of the pollinator lines on the flower morphology of the cybrids.

Discussion

Our study shows that the three cybrid mitochondrial genomes have been rearranged as pattern differences, in comparison to fertile chicory, were observed when the RFLP analyses were made in the vicinity of the *atpA*, *atp6*, *coxII*, *cob*, *rrn18* and *rrn26* genes. In addition, regions of the sunflower mitochondrial genome were introduced into the cybrid mitochondrial genomes. A previous study made on the 411 cybrid fourth progeny, in an industrial nuclear context, had showed a high degree of polymorphism in the *atpA* and *cob* regions (Rambaud *et al.*, 1997). Our study, made on plants backcrossed over more generations, shows that the mitochondrial genomes evolve towards a general stabilisation as shown by the $I_{411\ a, b, c, \dots}$ polymorphism for the sunflower *atpA* presence and the homogeneity displayed in V_{411} in the same region. From the results observed for the $I_{411\ a, b, c, \dots}$, after *atpA* hybridisation, two hypotheses can be made to understand the origin of the additional *atpA* fragment, differing from the fertile chicory one, observable for certain plants.

- i) It could originate from a sunflower subgenomic circle exhibiting at least the 9 kb *HindIII-atpA* fragment. This subgenomic circle could have been maintained in the cybrid cytoplasm with the chicory mitochondrial genome during a few generations leading to an heteroplasmic situation.
- ii) The second *atpA* fragment may come from the sunflower *atpA* gene introduced into the chicory mitochondrial genome, near an *EcoRV* site, through recombination events. This hypothesis implies that a complicated mitochondrial genome structure, induced by protoplast fusion (2 *atpA* copies) evolves towards a simplified structure.

We are more in favour of the second hypothesis since the probability for two different mitochondrial genomes to keep separate, as suggested in i) is low compared to cross-rearrangements events proposed in ii).

The stabilisation process cannot be generalised to the complete mitochondrial genome. In fact, a slight instability remains, as RFLP is observed on major bands for the 411 and 523 cybrids when *cob* gene is used as probe. Instability can also be noticed for the three cytoplasms when *coxII* is used as a probe, after *EcoRV* digestion (data not shown), but it is difficult to study due to a very weak signal. The absence of polymorphism observed in the 524 plants in the *cob* region, when polymorphism was observed for 411 and 523 cytotypes, shows that, if mitochondrial genomes evolve towards stabilisation, this one can be achieved with different speeds for the three mitochondrial genomes.

Unlike the study made on the *Brassicaceae* family (Sakai and Imamura, 1992), in which mitochondrial genome stabilises rapidly, the mitochondrial genome of CMS chicory cybrids is not completely fixed after several generations of backcrosses. There is no evidence that the whole mitochondrial genome will stabilise, i.e. that the mitochondrial genome structure will be identical when different generations are compared. It is possible that a slight instability will remain in certain mitochondrial regions, with the mitochondrial genome structure being in balance between two or more configurations.

When the 411, 523 and 524 cybrids are stabilised in the *atpA* region, but the *atpA* region differs between the 411 and 523 cybrids which present a typical fertile chicory patterns and the 524 cybrids which exhibit a new pattern (different from CMS sunflower and fertile chicory). Thus, stabilisation can be different for the same mitochondrial areas in respect to the cytoplasm studied. On one hand the *coxII* mitochondrial area confirms this difference, as three different stable profiles were observed for the three cybrids (after *EcoRI* digestion). On the other hand, stoichiometric differences observed for the cybrids in this region could signify that certain fragments presenting weak signal correspond to fragments in process of being eliminated. However, we can observe common features. The three cytotypes in the *atp6* and *rrn18* regions show identical profiles, as they are different from the two parents. This is not surprising because the mitochondrial regions, allowing rearrangements and recombination events, were identical when the two mitochondrial

structures of chicory and sunflower protoplasts were fused, yielding common modification possibilities.

In our model, after symmetric protoplast fusions without any pre-treatment for selecting the chicory mitochondrial genome, there is a preference for the maintenance of chicory mitochondrial genome, as even though sunflower or new hybrid bands can be observed, the chicory bands are more frequent when all the RFLP analyses are taken into account. Possibly the chicory nuclear genome sends more appropriate signals to the chicory mitochondrial genome than to that of sunflower. Alternatively among all the possible recombined genomes, only those which carry a majority of chicory mitochondrial genes will be selected in a chicory nuclear context. This can be interpreted as a nuclear-organelle incompatibility as mentioned by Rose *et al.* (1990). Sunflowers were never regenerated with the media used to cultivate protoplasts after fusion. This result suggests that our medium was not suitable for sunflower and that the sunflower nucleus was not maintained after fusion. Therefore, the sunflower mitochondria, in the cybrid, must have received chicory nuclear information. This result is in accordance with the fact that mitochondrial segregation is influenced by genetic divergence between the partners fused (Bonnett and Glimelius, 1983). Differences in the protoplast origin (mesophyll for chicory and hypocotyl for sunflower) could have produced protoplasts with different numbers of mitochondria. Moreover, differences in mitochondrial replication rates could have emphasized the progressive elimination of sunflower mitochondrial genome, whilst keeping the sunflower sequences introduced into the chicory mitochondrial genome by recombination events. The different mitochondrial structures, observed when the three cybrids are compared and the polymorphism observed in the I_{411a, b, c} plants, could be explained by the random segregation of a heterogeneous mitochondrial genome population. On the one hand, the polymorphism observed among the I_{411 a, b, c} plants could originate from the cloning step as when plant cells are subjected to stress, such as tissue culture or somatic cell fusion, reorganisation of the mitochondrial genome may be triggered and changes in the restriction profiles are not uncommon (Shirzadegan *et al.*, 1991). Hartmann *et al.* (1989) have also shown that amplification and segregation of rearranged mitochondrial genomes occur dynamically during tissue culture. On the other hand, polymorphism was noticed for the fourth 411 progeny, backcrossed with industrial chicory, showing that the cloning step is not the only explanation for the polymorphism observed in the clone. Although certain new mitochondrial gene-structures observed at the beginning (after protoplast fusions) have disappeared, the structure(s) modification(s) causing CMS are still maintained as the cybrid progenies remain male-sterile (except when backcrossed with Jupiter).

Our study on the nuclear influence on the mitochondrial gene structure showed that the mitochondrial genome stabilised the same way, regardless of the pollinator used for backcrosses. The nucleus does not seem to have any major influence on the mitochondrial genome stabilisation. On the contrary, pollinators seem to influence cybrid floral-morphology. Chicories can carry

flowers without anther, with brown anthers or normal blue anthers with pollen, depending on the pollinator used. Because all the mitochondrial structures stabilised the same way regardless of the pollinator used and because Jupiter pollinator restores the three cybrid male fertility, we can conclude that these flower phenotypic differences are the result of nuclear effects and not of differences in mitochondrial structures. The Jupiter pollinator thus carries nuclear restoration gene(s). This could mean that determinants inducing CMS, in the three cybrids, are identical because they are restored by the same pollinator even if their mitochondrial structures are different. Alternatively, if the CMS determinants are different in the three cytypes, the Jupiter line must carry restorer genes for each CMS. If the cybrids carry the same CMS, we should observe common features for the three cybrid mitochondrial genomes, those common features being differences when the cytypes will be compared to fertile chicory control and cybrid revertants. When floral morphology was studied for the 523 cybrid clone, (I₅₂₃), to verify that the plants analysed were male-sterile, certain plants exhibited flowers with brown anthers and some other plants flowers without any anthers. The chosen plant for the *in vitro* culture had already been crossed twice with the Jupiter pollinator that restores fertility, but at that time this result was ignored and the differences observed were considered as somatic segregation. Now they can be understood as a nuclear restoration effect of the Jupiter genotype.

As described in details in literature, mitochondrial genome presents a large ability for recombination events, this fact contributing to the mitochondrial genome evolution (Bonen and Brown , 1993). This evolution is achieved in terms of mitochondrial genes order modifications but not in terms of modifications in the gene sequence. The repeated sequences, spread out in the mitochondrial genome, allow these rearrangements. Small repeated sequences could induce mitochondrial gene sequence modifications. Somatic hybridisation, by protoplast fusion, lead to the confrontation, in the same cell, of two mitochondrial structures, originating from the two fused partners. Because of the good mitochondrial gene conservation, recombination events can involve the two different mitochondrial genomes leading to the existence, in the somatic hybrids, of a new mitochondrial genome presenting similarities with the two parents and presenting new characteristics as well. Thus, somatic hybridisation can be considered as a good process to induce mitochondrial genome rearrangements.

Our study confirms the possibility of rearrangements between the mitochondrial genomes of the two partners fused. Common features shared between 411, 523 and 524 cybrids (identical new bands originating from rearrangements or typical fertile chicory profiles) seem to be logical because most of the parameters influencing mitochondrial stabilisation and segregation were identical. Differences observed between the three cytypes could be understood as resulting from random segregation. Finally, even if the 411, 523, 524 cybrids, nearly stabilised, display different structures, the mitochondrial CMS determinant was maintained across generations and could be of the same nature

because of restoration results. The CMS determinants could originate from a sunflower mitochondrial sequence introduction, recombined in the chicory mitochondrial genome. This determinant could correspond to *orf522*, responsible for CMS in sunflower when it was introduced into the chicory mitochondrial genome and maintained (Dubreucq *et al.*, in preparation).

Acknowledgements: We thank W. Hauswirth for providing the *atpA*, *atp6*, *atp9*, *coxII*, *coxIII*, *cob*, *rrn18* and *rrn26* genes probes and C.S. Levings for providing the *coxI* gene probe, the INRA for providing pollinators seeds, the Etablissements Florimond-Desprez for providing the sunflower seeds and F. Budar for critical reading of the manuscript. This work was supported by INRA and Région Nord Pas de Calais.

We declare that the experiments comply with the current laws of France in which the experiments were performed.

References

- Bonen L., Brown G.G. (1993). Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organisation and expression in plant mitochondria. *Can. J. Bot.* 71, 645-660
- Bonhomme S., Budar F., Férault M., Pelletier G. (1991). A 2.5 kb *Nco I* fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* cybrids. *Curr. Genet.* 19, 121-127
- Bonnett H.T., Glimelius K. (1983). Somatic hybridisation in *Nicotiana*: behaviour of organelles after fusion of protoplasts from male-fertile and male-sterile cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 65, 213-217
- Clarck E., Schnabelrauch L., Hanson M.R., Sink K.C. (1986). Differential fate of plastid and mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 72, 748-755
- Connett M. B., Hanson M.R. (1994). Molecular studies of cytoplasmic male sterility in *Petunia*. E.G. Williams et al. (eds). *Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants*. 513-530
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1, 19-21
- Evans D.A., Bravo J.E., Kut S.A., Flick C.E. (1983). Genetic behaviour of somatic hybrids in the genus *Nicotiana*: *N. glauca* + *N. glauca* + *N. glauca*. *Theor. Appl. Genet.* 65, 93-101
- Hartmann C., Henry Y., De Buyser J., Aubry C., Rode A. (1989). Identification of new mitochondrial genome organisations in wheat plants regenerated from somatic tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 77, 169-175
- Heller R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14, 1-223
- Kemble R.J., Barsby T.L., Wong R.S. C., Shepard J.F. (1986). Mitochondrial DNA rearrangements in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 72, 787-793
- Köhler R.H., Horn R., Lössl A., Zetsche K. (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 227, 369-376
- Kothari S.L., Monte D.C., Widholm J.M. (1986). Selection of *Daucus carota* somatic hybrids using drug resistance and characterisation of their mitochondrial genomes. *Theor. Appl. Genet.* 72, 494-502
- Landgren M., Glimelius K. (1990). Analysis of chloroplast and mitochondrial segregation in three different combinations of somatic hybrids produced within *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 80, 776-784
- Landgren M., Glimelius K. (1994 a). A high frequency of intergenomic mitochondrial recombination and an overall biased segregation of *B. campestris* or recombined *B. campestris* mitochondria were found in somatic hybrids made within *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 87, 854-862

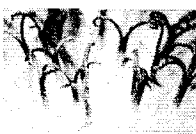
411 ALG		[sans anthère]	524 ALG		[sans anthère]
411 AXQ		[sans anthère]	524 AXQ		[sans anthère]
411BLH		[anthères brunes]	524BLH		[sans anthère] fertilité ♀ médiocre
411BSJ		[anthères brunes]	524BSJ		[sans anthère]
411 Jup		[fertile]	524Jup		[fertile]

Figure 11: Effet du noyau sur la morphologie florale des cybrides 411 et 524.

- Landgren M., Sundberg E., Glimelius K. (1994 b). Biased mitochondrial segregation, independent of cell type used for fusion and of hybrid nuclear DNA content, was found in *Brassica napus* (+) *B. oleracea* somatic hybrids. *Plant Sci.* 103, 51-57
- Laver H.K., Reynolds S.J., Moneger F., Leaver C.J. (1991). Mitochondrial genome organisation and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J.* 1, 185-193
- Levings C.S. III (1993). Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell.* 5, 1285-1290
- McCarty D.M., Hehman G.L., Hauswirth W.W. (1988). Nucleotide sequence of the *Zea mays* mitochondrial cytochrome oxidase subunit III gene. *Nucl. Acids Res.* 16, 20, 9873
- Monéger F., Smart C.J., Leaver C.J. (1994). Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. *EMBO J.* 13, 8-17
- Morel E., Wetmore R.H. (1951). Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.* 38, 141-143
- Muise R.C., Hauswirth W.W. (1992). Transcription in maize mitochondria: effects of tissue and mitochondrial genotype. *Curr. Genet.* 22, 235-242
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- Palmer J.D., Herbon L.A. (1987). Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 11, 565-570
- Pelletier G., Chupeau Y. (1984). Plant protoplast fusion and somatic plant cell genetics. *Physiol. Vég.* 22, 377-399
- Rambaud C., Bellamy A., Dubreucq A., Bourquin J.-C., Vasseur J. (1997). Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from cytoplasmic male sterile chicory cybrid. *Plant Breeding.* 116, 481-486
- Rambaud C., Dubois J., Vasseur J. (1993). Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion *Theor. Appl. Genet.* 87, 347-352
- Rose R.J., Thomas M.R., Fitter J.T. (1990). The transfer of cytoplasmic and nuclear genomes by somatic hybridisation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 17, 303-321
- Sakai T., Imamura J. (1992). Alteration of mitochondrial genomes containing *atpA* gene in the sexual progeny of cybrids between *Raphanus sativus* CMS line and *Brassica napus* cv. Westar. *Theor. Appl. Genet.* 84, 923-929
- Shirzadegan M., Palmer J.D., Christey M., Earle E.D. (1991). Patterns of mitochondrial DNA instability in *Brassica campestris* cultured cells. *Plant Mol. Biol.* 16, 21-37

3.1.1. Résultats complémentaires - Morphologies florales

Au début des rétrocroisements effectués à l'INRA de Versailles, avec des pollinisateurs porteurs de noyaux chicorée endive, les morphologies florales des plantes étaient variables puisqu'une ségrégation au niveau de la présence ou non d'anthères brunes était observée. Après 5 générations de rétrocroisements avec le même pollinisateur, la morphologie florale est stabilisée. Les cybrides possèdent maintenant un noyau dont le degré de pureté théorique est de 96,875% par rapport au noyau du pollinisateur. On peut donc penser que la variabilité de la morphologie florale était imputable à l'instabilité du génome mitochondrial mais aussi à l'hétérogénéité nucléaire des descendants. L'emploi de certains noyaux a permis une stabilisation de la sm vers une morphologie florale sans anthère (noyaux ALG, AXQ, Rub) qui est préférable pour une utilisation agronomique. Les noyaux de type B (BLH et BSJ) permettent une stabilisation de la présence d'anthères brunes avec le cytoplasme 411, par contre avec le cytoplasme 524, la majorité des plantes portant ce noyau présente des fleurs sans anthère. Le noyau Jupiter a permis la restauration de la fertilité des trois cytotypes. L'utilisation de différents pollinisateurs a donc permis de montrer que le génome nucléaire a une grande influence sur la morphologie florale (fig. 11) mais que celle-ci dépend en partie du génome mitochondrial auquel il est associé.

Pour les cybrides présentant une morphologie florale sans anthère (411 AXQ, 524 AXQ, 524 BSJ), une première étude cytologique des boutons à un stade précoce (2 à 3 mm de long), réalisée par N. Martin (1996) à l'INRA de Versailles, a permis de montrer qu'il se développe un manchon staminal réduit à un simple dôme cellulaire sans cellule mère des microspores ou uniquement des ébauches des filets d'anthères sans trace de cellule mère. Par la suite (bouton de 4 mm de long), ces ébauches disparaissent. Dans ce cas, il semble que le développement des anthères s'arrête très précocement. Des coupes d'anthères brunes de cybrides 411 BSJ, ont permis d'observer le stade des files de microspores. Les premières anomalies sont, le plus souvent, observées dès le stade tétrade. Le stade le plus avancé qui a pu être observé, chez ces plantes, correspond au stade microspore uninuclée. Il serait intéressant de poursuivre et d'élargir cette étude cytologique en étudiant les trois cytotypes, dans différents contextes nucléaires ainsi que les plantes 411 révertantes.

En plus de la sm constatée dans les trois cybrides étudiés, il faut noter que d'autres différences ont pu être observées chez les plantes 411, 523 et 524: baisse de la fertilité femelle, problème de vigueur, morphologie anormale de certaines feuilles, éclatement des boutons floraux avant l'épanouissement de la fleur, fleurs de couleur claire et de taille réduite,

faible pourcentage de nouaison. D'autre part, il s'est avéré que les trois cybrides n'avaient pas la même valeur agronomique:

- les cybrides 523 se montrent très sensibles à l'oïdium. Les feuilles sont étroites et rigides. Le limbe se développe parfois de façon asymétrique, par rapport à la nervure centrale. En culture *in vitro*, les bourgeons s'enracinent plus difficilement que les bourgeons des deux autres cybrides. Les plantes développent des fleurs *in vitro*, sans vernalisation, alors que les deux autres cybrides n'ont jamais présenté ce phénomène.

- les semences des plantes 524 ont parfois présenté une mauvaise énergie germinative. La fertilité femelle est inférieure à celle des témoins fertiles.

- les cybrides 411 présentent plus d'anomalies dans leur développement dans un contexte nucléaire B que dans un contexte nucléaire A.

Ces résultats suggèrent que les remaniements observés au niveau du génome mitochondrial agissent non seulement sur la microsporogenèse mais ont également une action au niveau des organes végétatifs ainsi que sur le mégagamétophyte.

Au début des rétrocroisements effectués à l'INRA de Versailles, les noyaux présentait une hétérozygotie importante (hétérozygotie chicorée endive/industrielle). Ce n'est qu'à partir d'un certain nombre de rétrocroisements que les problèmes de manque de vigueur et de fertilité femelle sont apparus, lorsque la vigueur hybride engendrée par l'hétérozygotie ne pouvait plus compenser les problèmes, certainement inhérents aux remaniements des génomes mitochondriaux.

De manière générale, on a pu observer que, dans un même contexte nucléaire, les cybrides 411 et 524 ne se comportaient pas de la même façon. D'autre part, dans des contextes nucléaires différents, un même cytotype ne se comportait pas non plus de la même façon. Ces résultats confirment que les cytoplasmes 411 et 524 sont différents et qu'il existe une relation étroite entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire.

D'autre part, lorsqu'il existe des problèmes de développement chez les chicorées fertiles, dans un cytoplasme normal, avec certains contextes nucléaires, les cytoplasmes 411 et 524, dans ces contextes nucléaires, amplifient les anomalies. Les cybrides 523 ont donné lieu à un nombre moins important d'observations car présentant de nombreuses anomalies au niveau de leur développement, ils n'ont pas permis de réaliser autant de croisements.

Comme différentes morphologies florales ainsi que du polymorphisme au niveau des profils de restriction étaient observables, nous avons essayé de mettre en évidence un lien entre certains profils RFLP mitochondriaux observés et certaines morphologies florales mais

cela n'a pas été possible car certaines plantes, présentant des profils mitochondriaux différents, présentaient des morphologies florales identiques et inversement. En effet, les cybrides 411 rétrocroisés avec des noyaux de type B présentent une morphologie florale avec anthères brunes alors que rétrocroisés avec un noyau de type A, ils présentent une morphologie florale sans anthère. Pourtant l'analyse RFLP du génome mitochondrial n'a pas permis de mettre en évidence de différences au niveau mitochondrial entre ces deux catégories de plantes.

Les plantes, utilisées au départ à l'INRA de Versailles, correspondant aux trois plantes choisies pour réaliser notre multiplication par culture *in vitro*, avaient déjà subi plusieurs croisements dans les "établissements Florimond-Desprez" (tableau 2). Pour chaque cytoplasme, toutes les plantes analysées, quel que soit le contexte nucléaire, proviennent de la même plante.

Parmi les noyaux utilisés pour les rétrocroisements, une lignée, Jupiter, s'est révélée restauratrice des trois cytotypes. Cette restauration semble impliquer une génétique complexe car la descendance des plantes mâle stériles, présentant un phénotype sans anthère, croisées pour la première fois avec Jupiter, présentent une morphologie florale avec anthères brunes. C'est à la deuxième génération de rétrocroisement avec ce noyau, qu'apparaît du pollen sur les anthères dont la couleur évolue vers le bleu. Ces plantes sont capables, alors, de s'autoféconder.

Dans l'hypothèse d'un seul gène de restauration, ce gène n'est pas dominant car le premier croisement avec Jupiter ne permet pas d'obtenir de restauration. Le gène de restauration n'est pas non plus récessif, car, dès le premier croisement, les fleurs présentent des anthères brunes, alors que les plantes stériles de départ présentaient une morphologie florale sans anthère. La restauration engendrée par la lignée Jupiter semble donc impliquer plusieurs gènes. L'hétérogénéité du noyau des plantes de départ avec des contributions variables d'ALG, BLH, β 91 et de chicorée industrielle, pourrait éventuellement avoir une influence sur la capacité des gènes de Jupiter à restaurer la fertilité dès la première génération. Après un autre rétrocroisement, la contribution de Jupiter devient majoritaire. Il semble donc que la restauration de fertilité entraînée par Jupiter ne constitue pas un cas simple de restauration occasionnée par un seul gène nucléaire dominant qui permettrait en effet d'obtenir 100% de plantes restaurées dès la première génération.

Pourtant, Jupiter a un effet sur la morphologie florale dès le premier croisement. Différentes hypothèses ont été émises dans lesquelles plusieurs gènes nucléaires, dominants ou non pourraient être impliqués.

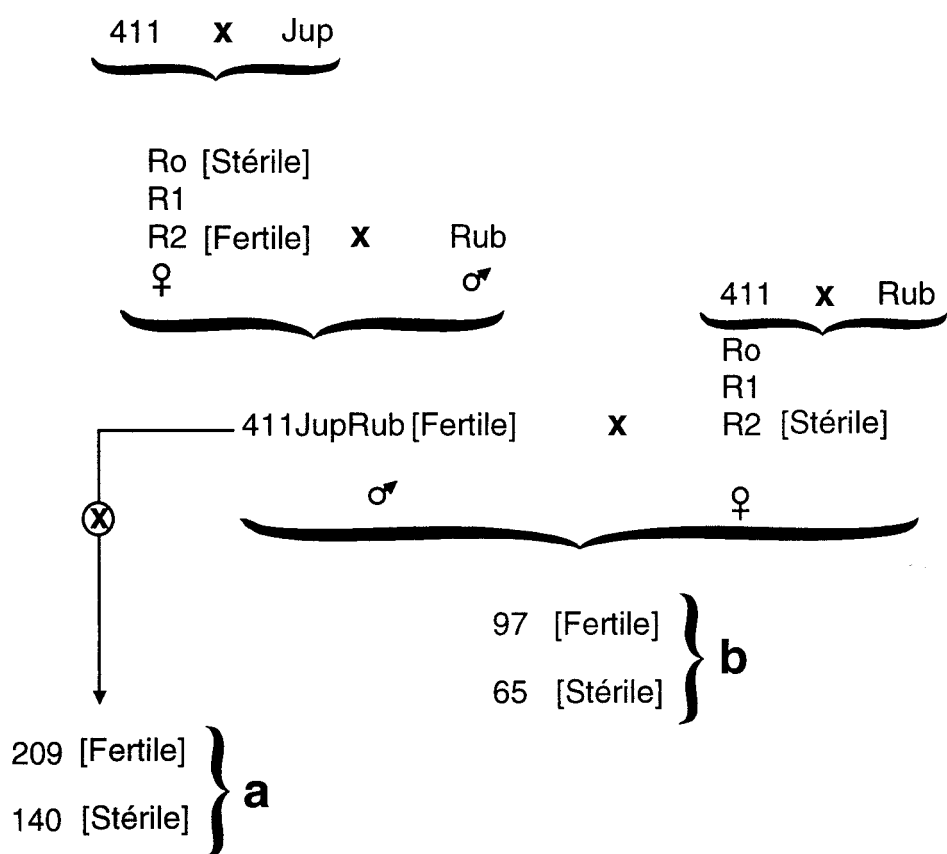


Figure 12: Croisements réalisés pour analyser la restauration du cybride 411 par le noyau restaurateur Jupiter. **a** : résultats des autofécondations. **b** : résultats des croisements de la plante (411Jup Rub) fertile par la plantes (R₂ 411 Rub) stérile.

Afin d'essayer de comprendre le mécanisme de restauration plusieurs types de croisements ont été réalisés (fig. 12).

Le cybride 411, choisi à l'INRA de Versailles au départ, a été croisé trois fois par Jupiter, donnant successivement les descendances R_0 , R_1 , R_2 . La plante R_2 restaurée a ensuite été croisée par Rub, bon mainteneur de stérilité. A l'issue de ce croisement, une plante fertile, $(411 \text{ Jup}) \times (\text{Rub})_1$, a été choisie. Cette plante a été autofécondée et a également servi à féconder un cybride 411 mâle stérile (R_2 411 Rub). La descendance de l'autofécondation a montré une ségrégation de la stérilité mâle: 209 plantes fertiles et 140 plantes mâle stériles. D'autre part, la descendance du croisement $((411 \text{ Jup}) \times (\text{Rub})_1) \times (R_2 \text{ 411 Rub})$, a également montré une ségrégation du caractère mâle stérile: 97 plantes fertiles et 65 plantes stériles (fig. 12).

Les résultats d'autofécondation (fig. 12 a) semblent en accord avec l'hypothèse de deux gènes dominants de restauration A et B, présents chez Jupiter et absents chez le mainteneur Rub:

Ségrégation de type 9/16 [Fertiles] (effectif théorique: 203) : 7/16 [Stériles]
(effectif théorique: 158).

Ségrégation de 2 gènes dominants indépendants

Par contre, les résultats des ségrégations obtenus pour les croisements (fig. 12 b) ne sont pas en accord avec l'hypothèse de deux gènes dominants de restauration. Il semble donc, que le mécanisme impliqué dans cette restauration soit très complexe. Néanmoins, les effectifs de cette étude étant faibles, il convient de rester prudent quant à ces hypothèses.

Il semble que les cytoplasmes 411 et 524 ne réagissent pas exactement de la même façon par rapport à la restauration engendrée par Jupiter. En effet, les cybrides portant le cytoplasme 524 sont plus difficiles à restaurer que les cybrides portant le cytoplasme 411 car la ségrégation dans un contexte cytoplasmique 524 se fait avec un avantage pour le phénotype stérile. D'autres déterminants plus complexes de la restauration, non connus, pourraient cohabiter avec ces multiples gènes restaurateurs.

3.1.2.Discussion

Les trois cybrides étudiés dans ce travail proviennent de trois événements de fusion différents. Cependant, les mêmes types de protoplastes parentaux ont été fusionnés. D'autre

part, les produits de fusion ont été soumis aux mêmes conditions de culture. Il est intéressant de constater que ces fusions ont conduit à l'obtention de trois cytotypes différents. On peut émettre l'hypothèse que les fusions ont conduit à des événements de recombinaison différents entre les génomes mitochondriaux parentaux. Ce résultat a déjà été observé chez le *Petunia* (Hanson et Condé, 1985). On peut aussi penser que les mêmes réarrangements ont eu lieu mais que les particules d'ADNmt ainsi engendrées ont ségrégué différemment. Plusieurs paramètres peuvent influencer cette ségrégation. La distance phylogénétique entre les partenaires de fusion ne peut pas ici expliquer les différences entre les trois cytotypes puisque les partenaires de fusion étaient identiques. La nature des explants à partir desquels les protoplastes ont été obtenus ainsi que l'état physiologique des plantes dont ils provenaient ne peuvent pas être pris en compte. Les plantes utilisées provenaient de très jeunes plantules de chicorée ou de germinations de tournesol cultivé *in vitro* toujours prélevées au même stade de développement. Après la fusion, les produits de fusion poursuivaient leur développement. A partir de ce stade, certains paramètres ne pouvaient plus être contrôlés: la vitesse de régénération de la paroi permettant ensuite les premières divisions, la durée nécessaire pour le développement d'un microcal puis le temps nécessaire pour la régénération, à partir du cal, de feuilles puis de racines pour parvenir à la régénération complète d'une plantule. Rode *et al.* (1987) ont constaté que la culture *in vitro* peut induire des remaniements profonds au niveau du génome mitochondrial. La phase de culture *in vitro* peut avoir eu cet effet. D'autre part, les divisions peuvent avoir engendré une ségrégation aléatoire des différentes molécules d'ADNmt, créées par les recombinaisons entre les deux génomes parentaux. On peut imaginer que des molécules nouvelles en commun dans les trois génomes ont été maintenues dans certains cybrides et perdues dans d'autres, par le jeu de cette ségrégation aléatoire. La phase de culture *in vitro* supplémentaire, lors du clonage d'une plante de chaque cytype, peut être considérée comme une étape occasionnant des remaniements dans le génome mitochondrial. Elle peut aussi avoir été un moteur supplémentaire à l'élimination d'une hétéroplasmie résiduelle, potentiellement encore présente lorsque les plantes ont été clonées.

Les variations des profils mitochondriaux observées dans les premières séries analysées (obtenues par culture *in vitro*) peuvent s'expliquer par une instabilité du génome mitochondrial ayant subi de profonds réarrangements et par l'influence des conditions de culture *in vitro* (Rode *et al.*, 1987). Dans notre cas, nous n'avons peut-être pas obtenu une multiplication conforme mais une néoformation indirecte puisqu'il a été fait usage d'hormones et que des structures nodulaires ont précédé l'apparition des bourgeons. Ce passage par une structure de type cal peut avoir engendré des modifications au niveau du génome mitochondrial et du génome nucléaire. Au stade de la multiplication végétative par culture *in vitro*, on peut également penser que nous étions en présence d'une population

hétérogène de molécules d'ADNmt, et que la ségrégation aléatoire opérée lors des divisions cellulaires a entraîné une perte de certaines structures. D'un autre côté, on peut penser que la phase de culture *in vitro* peut avoir généré le polymorphisme des fragments de restriction observé. Enfin, des variations de l'ADNmt ont également été observées dans la descendance de plantes croisées pendant quatre générations par des chicorées industrielles (Rambaud *et al.*, 1997), ce résultat suggérant que la culture *in vitro* seule n'est donc pas responsable de cette forte hétérogénéité.

L'analyse RFLP, portant sur l'influence éventuelle du noyau sur la stabilisation du génome mitochondrial, a permis de montrer que les 3 génomes mitochondriaux se sont fixés indépendamment du contexte nucléaire dans lequel ils se trouvaient et en particulier dans le contexte Jupiter, qui restaure la fertilité mâle. Ce résultat nous permet déjà de penser que, si les déterminants de la smc des cybrides 411, 523 et 524 se situent au niveau des régions qui ont été analysées, avec les différentes sondes mitochondriales utilisées, la restauration de fertilité ne s'accompagne pas comme chez le haricot d'une modification de la structure mitochondriale (Mackenzie *et al.*, 1994). Ces résultats semblent donc suggérer que la restauration de la fertilité mâle se situe au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, comme c'est le cas chez le tournesol (Smart *et al.*, 1994).

En ce qui concerne l'uniformité constatée des génomes mitochondriaux en fonction du contexte nucléaire, il faut cependant noter que les noyaux de chicorée utilisés étaient très proches puisqu'il s'agissait toujours de noyaux de chicorée endive. Il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus en comparant les cybrides rétrocroisés avec des noyaux plus distants phylogénétiquement: on pourrait par exemple comparer les structures mitochondriales dans un contexte nucléaire de chicorée endive et dans un contexte nucléaire de chicorée industrielle.

A l'issue de cette analyse RFLP, on peut noter que les trois génomes se sont largement stabilisés. Toutefois, il serait intéressant de suivre l'évolution des régions mitochondriales pour lesquelles on note encore un peu de polymorphisme afin de vérifier si, à terme, les génomes mitochondriaux seront complètement stabilisés.

Il est possible que les problèmes de vigueur, de fertilité femelle et d'énergie germinative observés chez les cybrides soient des conséquences d'un mauvais fonctionnement des mitochondries des trois cytotypes dans un contexte chicorée endive. Il est possible aussi qu'une partie de ces défauts trouvent leur origine dans une mauvaise interaction entre le génome mitochondrial de la chicorée industrielle (génome cytoplasmique des cybrides plus ou moins réarrangé) et le génome nucléaire de la chicorée endive. Pour tenter de dissocier les problèmes engendrés par le cytoplasme lui-même des problèmes engendrés par un

dysfonctionnement entre la mitochondrie et le noyau, il serait intéressant d'observer le comportement de chicorées industrielles fertiles rétrocroisées avec des chicorées endives fertiles ainsi que d'observer les trois cytotypes dans un contexte chicorée industrielle. Ces croisements permettraient d'observer, éventuellement, un dysfonctionnement entre des mitochondries de chicorées industrielles fertiles et les noyaux de chicorées endives fertiles. Toutefois, il faut noter que, lors des analyses RFLP effectuées, des comparaisons des profils de restriction des chicorées endives et des chicorées industrielles n'ont pas permis de mettre en évidence des différences au niveau de la structure de l'ADNmt. Il est cependant possible que l'utilisation d'autres sondes mitochondriales permettent de mettre en évidence de telles différences.

Résultats : chapitre III

Analyse de la présence/ absence de l'*orf522* et de son expression dans les cybrides 411, 523 et 524

3.2. Article 2

MOLECULAR ANALYSES OF THREE CMS CHICORIES ORIGINATING FROM
PROTOPLAST FUSION BETWEEN FERTILE CHICORY AND CMS SUNFLOWER:
IS *ORF522* RESPONSIBLE FOR CMS OF CHICORY?

Anne Dubreucq, Jean-François Asset, Françoise Budar², Jacques Vasseur, Caroline Rambaud¹

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse végétales, USTL/ INRA. Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq.

² Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

¹ For correspondence

Caroline Rambaud

USTL, Bâtiment SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex

Tel. : 03 20 43 66 78

Fax: 03 20 33 60 44

Abstract: Cytoplasmic male sterile (CMS) chicories were previously obtained by somatic hybridisation between fertile chicory protoplasts and CMS sunflower protoplasts. In this study, we determined the presence/absence of the *orf522* sequence, responsible for CMS in sunflower, in three CMS chicory cybrids, 411, 523 and 524, originating from three different protoplast fusion events. As *orf522* transcription is linked to *atpA* mitochondrial gene expression in sunflower, we determined whether *orf522* sequence was introduced in the CMS chicory mitochondrial genomes with the sunflower *atpA* gene. When *orf522* sequence was detectable, its expression was monitored to determine whether it could be responsible for CMS in the three chicory cybrids. PCR and RFLP analyses revealed that *orf522* was present in 2 of the 3 cytoplasms studied, namely 411 and 523, but was absent from the other 524 cytoplasm. From this result, we can conclude that *orf522* is not determining CMS in 524 cybrid. In the 411 cytoplasm, *atpA* and *orf522* were initially linked but after several generations of backcrosses, the *atpA* sunflower gene was progressively eliminated after rearrangements in the *orf522* 5' region. In the 523 cybrid, the *orf522* sequence was detected, but never linked to the *atpA* sunflower gene. Concerning the *orf522* expression, in the 411 sterile, revertant or restored cybrids, a very weak amplification signal could be observed after RT-PCR amplification. A stronger amplification was observed for 523 cybrid but no hybridisation signal could be detected in the 411 and 523 cybrids after northern blot analyses, using *orf522* sequence as probe.

KEY WORDS: *Cichorium intybus* L., *Helianthus annuus* L., mitochondrial recombination, *orf522*, cytoplasmic male sterility

Introduction

Male sterility is characterised by the inability for a plant to produce functional pollen. Two different groups of male sterility have been described in accordance to their inheritance: nuclear male sterility inherited like a mendelian character (MST) and cytoplasmic male sterility inherited like a maternal character originating from cytoplasmic determinants (CMS). CMS can appear spontaneously, but can also be induced by inter- or intra-specific crosses between sexually compatible species. It can, finally, be obtained by protoplast fusion between sexually incompatible species. Nearly all studies on different CMS have reported the existence of mitochondrial determinants (Bonen and Brown, 1993, Vedel *et al.*, 1994). Because CMS can be restored by nuclear genes, it is thought to result from nuclear-mitochondrial dysfunction. CMS inducing determinants can originate from recombination events leading to the creation of a novel open reading frame (*orf*) transcribed and translated into novel polypeptides. In the case of alloplasmic CMS, these *orfs* may already exist in the cytoplasm donor species, their expression being inhibited by their coexistence in this species with nuclear restoration genes. Such silent CMS genes can be revealed in an alloplasmic situation, after crosses and/or protoplast fusion. Restorer genes can induce the CMS determinant loss (He *et al.*, 1995), or as in most studied cases act on its expression at the post transcriptional level (Krishnasamy and Makaroff, 1993, Tang *et al.*, 1995, Monéger *et al.*, 1994). CMS is conveniently used for hybrid seed production because it avoids manual castration. In the case of crops cultivated for seed production, restorer gene(s) are required in the pollinator to restore male fertility and allow self-pollination in the produced hybrids.

CMS had never been observed either spontaneously or after intra or interspecific crosses in the *Cichorium* genus. Because *Cichorium intybus* L. may be highly autogamous (Bellamy *et al.*, 1996), CMS in chicory was very interesting for hybrid seed production. Rambaud *et al.* (1993) obtained CMS chicories by somatic hybridisation, fusing industrial fertile chicory protoplasts with PET1 CMS sunflower protoplasts. CMS sunflower protoplasts were used because they were phylogenetically far enough to prevent nucleus fusion but close enough to allow mitochondrial rearrangements between chicory and sunflower mitochondrial genomes.

Genetic analyses on PET1 CMS sunflower showed that CMS is correlated with a specific mitochondrial genome arrangement. PET1 CMS sunflower only differs from fertile sunflower in a 17 kb mitochondrial fragment hybridising to the *atpA* gene (Laver *et al.*, 1991). The 17 kb sequence displays the existence of a new gene, *orf522*, located downstream of the *atpA* mitochondrial gene. Thus the *atpA-orf522* fragment can be detected in male sterile and restored sunflowers (Laver *et al.*, 1991, Köhler *et al.*, 1991). The *orf522* is cotranscribed with the *atpA* gene forming an extra 3 kb transcript that hybridises to *atpA* probes in addition to the 1.9 kb RNA found in fertile and CMS sunflower corresponding to the *atpA* monocistronic mRNA. The *orf522* translation product, a 15 kDa polypeptide, is found in CMS sunflowers, regardless of the explant

used for the analysis. Because it presents hydrophobic regions, the protein is thought to be located in the mitochondrial inner membrane (Monéger *et al.*, 1994). The protein thought to be responsible for sunflower CMS as it is in reduced quantity only in male florets from restored sunflowers, whereas its accumulation is not changed in other tissues. Northern blot analyses, using seedling RNA and male floret RNA, show a flower-specific reduction in the level of the *orf522* transcript in the restored hybrid line. Run-on experiments demonstrated that this reduction is not due to a reduced transcription rate (Monéger *et al.*, 1994). At least one of the two nuclear genes for fertility restoration seems to act at the post-transcriptional level to destabilise the novel mitochondrial transcript in a tissue-specific manner (Monéger *et al.*, 1994).

Different protoplast fusion events between fertile chicory and CMS sunflower gave independent male sterile chicories. First analyses made on their mitochondrial genome showed that CMS chicories had incorporated a large part of the sunflower mitochondrial genome (Rimbaud *et al.*, 1993). One CMS chicory, presenting the 411 cytoplasm was shown to have received the *orf522* sequence in its mitochondrial genome after the protoplast fusion. The 411 chicory fourth progeny after backcrosses with an industrial chicory, exhibited mitochondrial polymorphism and the *orf522* gene was maintained through generations (Rimbaud *et al.*, 1997). Three CMS chicories, namely 411, 523 and 524, originating from three different protoplast fusion events, were backcrossed with witloof chicories, used as pollinator, to transfer those cytoplasms from an industrial chicory nuclear context to a witloof chicory nuclear context. Previous analyses showed that the three mitochondrial genomes were different, evolving towards stability, a slight instability remaining for certain regions of the mitochondrial genome. The different pollinators used for backcrosses were shown to have no influence on the mitochondrial genome stabilisation. The nuclear genotype of the pollinator does however influence flower morphology. One particular pollinator, Jupiter, was found to restore fertility (Dubreucq *et al.*, in preparation).

In this work, we address the question of the *orf522* gene and its involvement in the CMS phenotype of the three different chicory cybrids. As RFLP analysis using *coxII* gene as a probe showed that the 3 cytoplasms were different, the aim of this work was to determine whether the three cytoplasms had incorporated the *orf522* sequence. Because the sunflower *atpA* gene was initially present in 411 mitochondrial genome and then lost, we wanted to know whether *orf522* was maintained across generations.

Materials and methods

Plant materials

For each cytoplasm studied, one plant without anther was chosen to be cloned by *in vitro* culture. The three clones constituted the first plants analysed ($I_{411\ a, b, c, \dots}$, $I_{523\ a, b, c, \dots}$, $I_{524\ a, b, c, \dots}$). The plant, chosen for the cloning step, was then backcrossed over 5 generations with different witloof

chicories used as pollinators (ALG, AXQ, BLH, Rub, Jupiter). The siblings, from the fifth generation of backcrosses, constituted the second series analysed ($V_{411\text{ a, b, c...}}$, $V_{523\text{ a, b, c...}}$, $V_{524\text{ a, b, c...}}$). One particular 411 plant, backcrossed with AXQ pollinator, segregated in CMS plants (411 AXQ ster.) and one fertile plant considered as a revertant 411 plant (411 AXQ rev.). Because fertility restoration could be obtained with Jupiter pollinator, a 411 fertile restored plant (411 rest.) was used in the molecular analysis. *Cichorium intybus* L. cv. Pévèle and *Helianthus annuus* cv. Mirasol (CMS line) (provided by Ets. Florimond Desprez), the two species used for protoplast fusions and the pollinators used for backcrosses, ALG, AXQ, BLH, Rub, Jupiter (provided by INRA, Versailles) were used as controls.

Methods

DNA isolation: Total DNA was extracted from chicory leaves or buds and from 10-days old dark grown Mirasol sunflower seedlings (according to Dellaporta *et al.*, 1983).

RNA isolation: Total RNA was extracted from chicory buds and from 10-days old dark grown Mirasol sunflower seedlings (according to Dean *et al.*, 1985).

Southern blot analysis: Total DNA (10 µg from each sample) was digested with restriction endonucleases (*EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* and *HindIII*, Appligène), separated by agarose (0,8 %) gel electrophoresis in 1 x TAE buffer (Tris 40 mM, EDTA 4Na 2 mM) and blotted to nylon membrane (Hybond N, Amersham) by vacuum blotting (Vacugene XL) according to the manufacturer's instructions (Pharmacia Biotech). After blotting, membranes were backed at 80°C for two hours. Hybridisation was performed overnight at 42 °C in 50 % formamide, 0,2 % (w/v) SDS, 1x Denhardt's solution (2 % BSA (w/v), 2 % PVP (w/v), 2 % ficoll 400 (w/v)), 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.375 M trisodium citrate pH 7), 20 mM NaH₂PO₄ and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Mitochondrial probes were radiolabelled by random priming using the T7 Quick Prime kit (Pharmacia) and then purified on a G50 Sephadex column (Pharmacia). Washes were performed at 45 °C in 6 x SSC-0,1 % (w/v) SDS for 10 min, 2 x SSC-0,1 % (w/v) SDS for 15 min and 0,2 x SSC-0,1 % (w/v) SDS for 30 min. The membranes were then autoradiographed using Hyperfilm-MP (Amersham), at -80 °C with an intensifying screen. Before the next hybridisation, membranes were stripped in 0,1 % (w/v) boiling SDS.

Northern blot analysis: Total RNA (20 µg from each sample) was mixed with 50% (v/v) of loading buffer (formamide 30% (v/v), 37% formaldehyde 9% (v/v), 10 x MOPS 5% (v/v), glycerol 3%

(v/v), 2% bromophenol blue 0,25% (v/v), ethidium bromide 0,25% (v/v)), heated during 10 minutes at 65°C and cool on ice. RNA samples were separated under denaturing conditions in 1,5% (w/v) agarose gel in 1 x MOPS buffer (MOPS pH 7.0 20 mM, sodium acetate 5 mM, EDTA pH 8.0 1 mM), formaldehyde 0.6M and transferred to nylon membrane (GeneScreen, Dupont) by capillarity blotting overnight in 20 x SSPE. After blotting, membranes were UV-crosslinked (120 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$). Hybridisations were performed overnight at 42 °C in 1 x SSPE, Formamide 50% (v/v), EDTA pH 8.0 1 mM, SDS 0,1% (w/v), 5 x Denhardt's and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA. Mitochondrial probe preparation and washes were performed as for southern analysis except that washes were performed with SSPE instead of SSC.

Reverse transcription: Total RNA (50 μg) was treated with 10 U of RNase-free DNase (Boehringer) at 37°C for 30 min, extracted with phenol/chloroform, and ethanol precipitated. Treated RNA (25 μg) were used for the reverse transcription which contained 1,25 mM of each dNTP, RNasin 80 U, DTT 10 mM, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , in a total volume of 50 μl , in the presence of 200 U of Super ScriptTM RNase H⁻ reverse transcriptase (Gibco BRL). The mixture was incubated for 2 hours at 37°C. The reaction was stopped by an incubation of 5 min at 100°C.

PCR amplification: The reaction mixture used for PCR amplification contained either 2 μl of reverse transcription reaction or 75 ng of total DNA, 10 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl_2 , a 1/10 of the volume of the 10 x buffer supplied with the Taq polymerase (Eurobio) which was used at 2.5 U per reaction mix, in total volume of 50 μl . Amplification was performed in a Trio Thermoblock (Biometra) thermocycler programmed for 30 cycles of: 30 sec at 94 °C, 30 sec at 60 °C, 1 min at 72°C with a first step before the 30 cycles of 3 min at 94°C and a final step of 5 min at 72°C. For *atpA* gene amplification the following oligonucleotides hybridising the 5' and the 3' end sequence were used: GGA ATT CTC TCC GAG AGC TGC TG (A) and GTG TAA GGC AAA GCG CAT TCC (B). For the *orf522* PCR amplification the following oligonucleotides were used: CCC CCT CCC TGG TGG ATC CGG CG (C) or ATG CCT CAA CTG GAT AAA TTC ACT TAT TTC (D) hybridising to the 5' end, CCC TCT ATG AGT ACC GTT CTC TCA CG (E) or TGA GTA CCG TTC TCT CAC GAG TTG AAG (F) hybridising to the 3' end.

DNA sequencing: The 800 bp fragment amplified after PCR was cloned in the pTag plasmid. The ligation was performed with the LigATor kit (R& D Systems Europe Ltd, 4-10 The Quadrant, Barton Lane, Abingdon, OX14 3YS, UK). DNA sequencing was performed by the dideoxy chain

termination method of Sanger *et al.* (1977) using the protocol supplied with the “Thermosequenase” kit (Amersham, Pharmacia Biotech.). Database searches were performed with Genbank/ EMBL.

Mitochondrial gene probes: *Orf522* probe was kindly provided by C.J. Leaver. *AtpA* probe was kindly provided by W. Hauswirth.

Results

Analysis of mtDNA.

The first question addressed was whether *orf522* gene was present in the CMS plants carrying each of the three studied cytoplasms and, if it was the case, whether it was in the *atpA-orf522* arrangement typical of sunflower. The *orf522* sequence is present in the 411 cybrid (Rambaud *et al.*, 1997). Other studies made on the three studied cybrids, 411, 523, 524, showed that after several generations of backcrosses the mitochondrial genomes were on their way to stabilise (Dubreucq *et al.*, in preparation). In this study, we wanted to determine whether *orf522* sequence was maintained in the 411 cybrid and whether the 523 and 524 cybrids had it introduced.

RFLP analysis revealed the *orf522* persistence in 411 cybrid. The 523 cybrid presented the *orf522* sequence while the 524 cybrid did not hybridise to this sequence. In order to verify the hybridisation results, PCR using oligonucleotides hybridising to the 5' and the 3' ends of *orf522* were performed to make sure that the 524 cybrid did not contain the *orf522* in such small amounts that it was undetectable on RFLP analysis (data not shown). Both 411 and 523 cybrids amplified a fragment, identical in length to the fragment amplified for CMS sunflower (fig. 1a, 1b). On the contrary, no amplification signal could be observed for the fertile chicory, Pévèle, or for the 524 cybrid (fig. 1c). The sunflower CMS determinant was not introduced into the 524 cytoplasm. On the contrary 411 and 523 present this sequence.

Because, in sunflower, *orf522* is cotranscribed with the *atpA* gene, we wanted to determine whether or not *orf522* was introduced with the sunflower *atpA* gene in the 411 and 523 cybrids. A PCR, using one oligonucleotide hybridising the 5' *atpA* end (A) and a second one hybridising the 3' *orf522* end (E) was done. In sunflower, the reaction amplified a 2.2 kb fragment in accordance with the size determined from the nucleotide sequence. In the 523 cybrid, the 2.2 kb fragment was never observed after PCR amplification (Fig. 2b). On the contrary, this fragment was amplified from 8 out of 24 I₄₁₁ plants (fig. 2a). Moreover, the majority of 411 plants and some 523 plants amplified a 800 bp fragment (fig. 2a, 2b). This result showed that, in the *orf522* vicinity, 411 cybrid plants displayed heterogeneity and led us to study the mitochondrial structure surrounding the *orf522* sequence in 411 and 523 cybrids. Thus an RFLP analysis was performed, using *orf522*

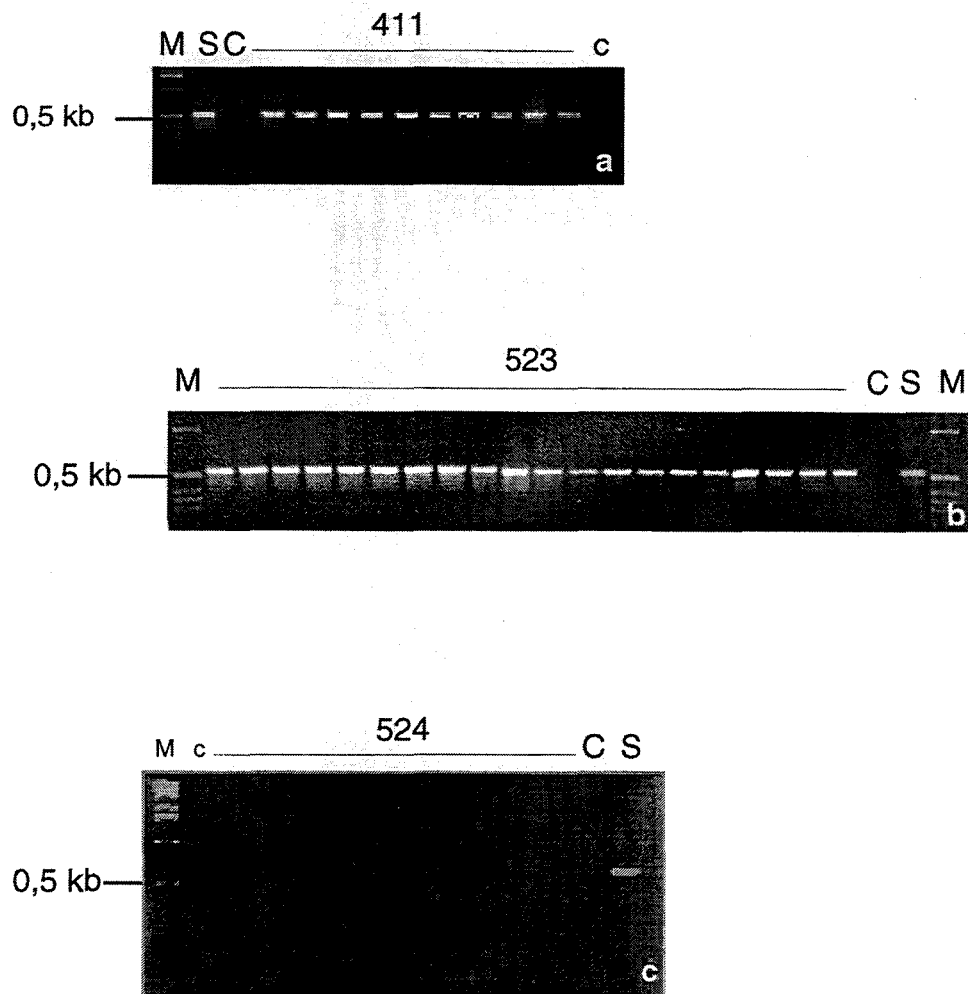


Fig. 1 a, b, c : PCR detection of the *orf522* sequence. Amplification reactions were performed using primers C and E. Lanes c contain the control reaction without substrate. C indicates the fertile chicory control, S indicates the CMS sunflower control. M indicates the molecular weight marker; a 1 kb ladder (BRL).

a The tested plants were 411 cybrids originating from the cloning step.

b The tested plants were 523 cybrids originating from the cloning step.

c The tested plants were 524 cybrids originating from the cloning step.

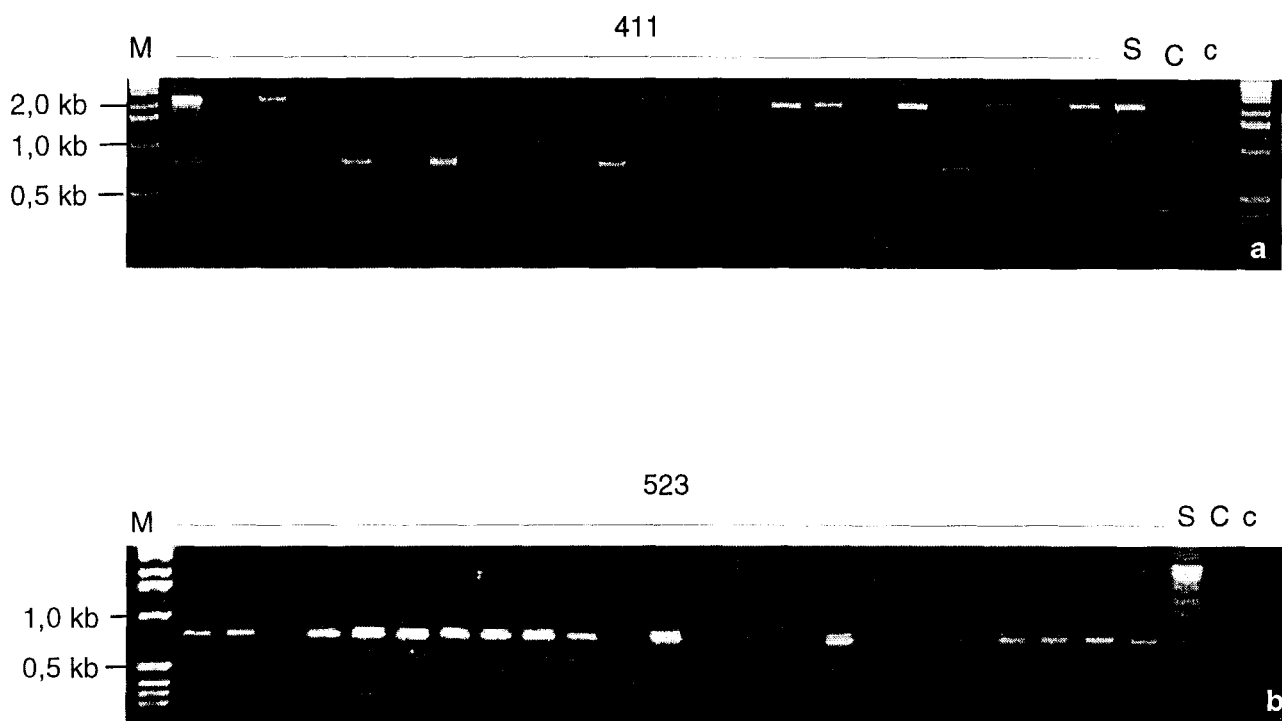


Fig. 2 a, b : PCR detection of the *atpA-orf522* CMS sunflower sequence. Amplification reactions were performed using primers A and E. Lanes c contain the control reaction without substrate. C indicates the fertile chicory control, S indicates the CMS sunflower control. M indicates the molecular weight marker; a 1 kb ladder (BRL).

a The tested plants were 411 cybrids originating from the cloning step.

b The tested plants were 523 cybrids originating from the cloning step.

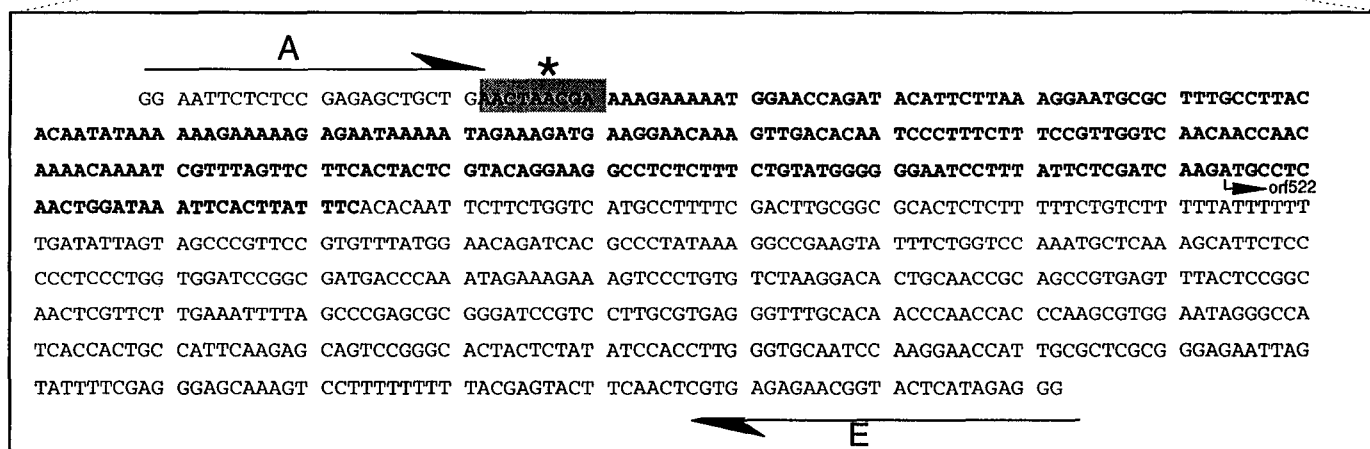
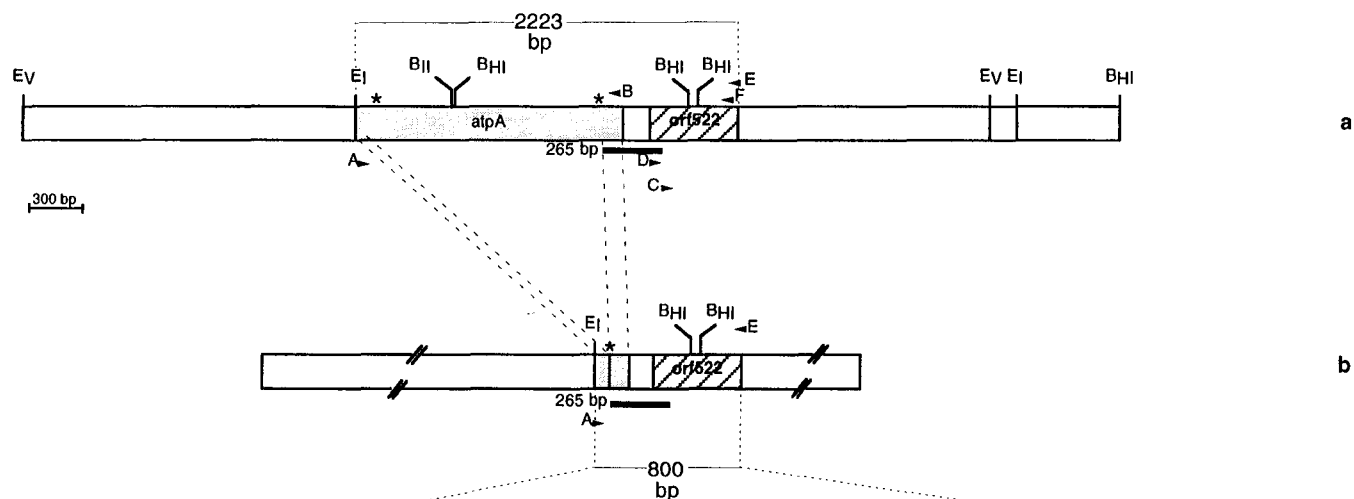


Fig. 3 a, b: **a** Restriction map of the *atpA-orf522* CMS sunflower region indicating the different restriction sites. Ei *EcoRI* restriction site; Ev *EcoRV* restriction site; BHI *BamHI* restriction site; BII *BglII* restriction site. **b** Nucleotide sequence of the 800 bp amplified after PCR reaction using the primers A and E. This reaction gave a 2.2 kb fragment with CMS sunflower DNA but amplified a 800 bp fragment with 411 and 523 cybrids DNAs. Arrows indicate the primers used for the amplification reaction. Bold types indicate the 265 bp inverted repeated sequence found in the CMS sunflower (Laver *et al.*, 1991). The stars indicate a 9 bp repeated sequence found in *atpA* sunflower gene in position 25 after the *atpA* ATG codon. The same sequence is found at the beginning of the 265 bp inverted repeat sequence.

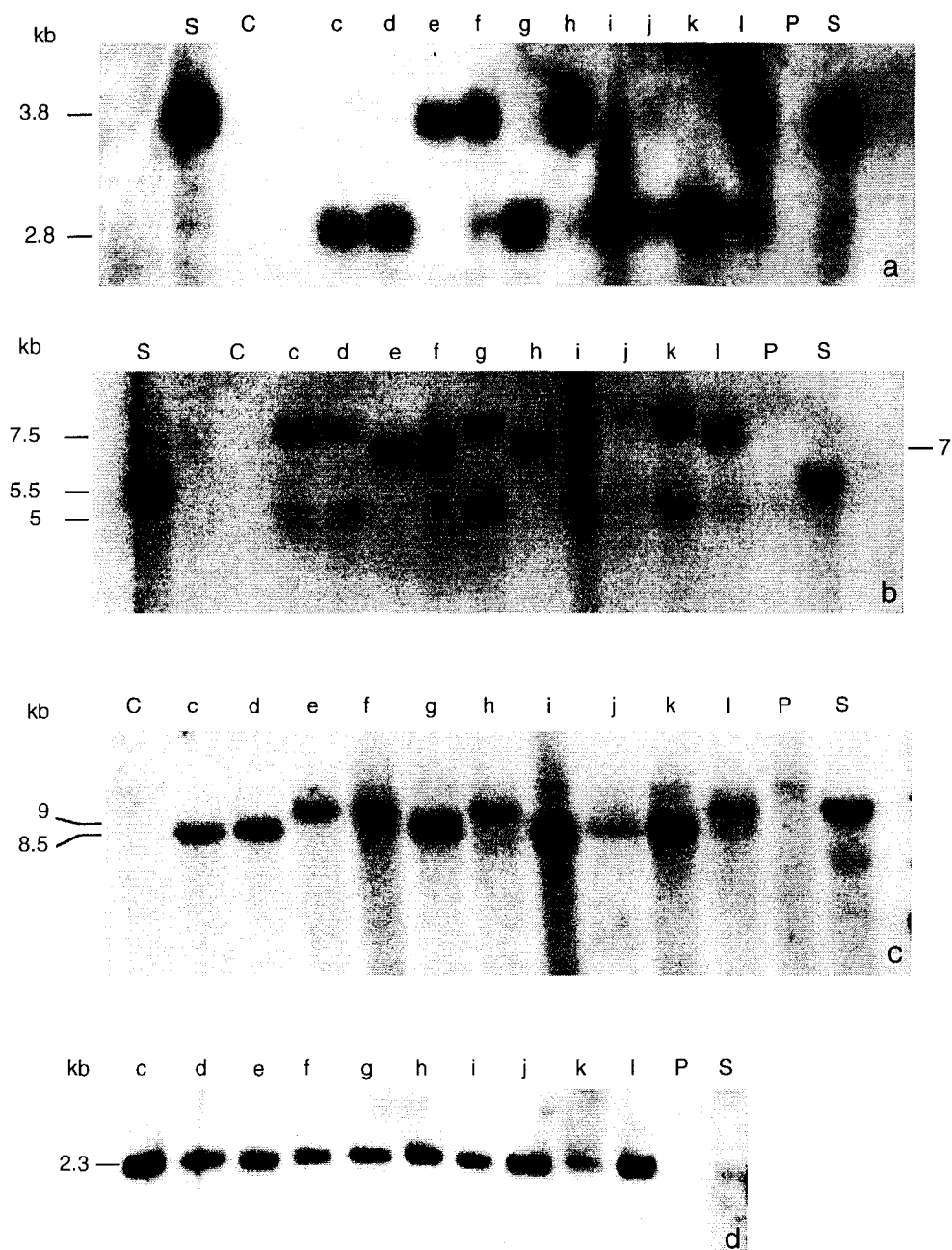


Fig. 4 a, b, c: Southern blot analysis of total DNAs from the parental species (chicory, *P*, CMS sunflower, *S*) and the 411 CMS chicory cybrids using *orf522* sequence as probe. Lane c to l, 10 "l 411" cybrids plants originating from the cloning step.

a: total DNAs digested by *EcoRI*.
b: total DNAs digested by *EcoRV*.
c: total DNAs digested by *HindIII*.
d: total DNAs digested by *BamHI*.

and *atpA* genes as probes against total chicory DNA digested with different restriction enzymes. In sunflower, *atpA* and *orf522* are located on a 3.8 kb *EcoRI* fragment, with only *BamHI* and *BglII* sites (fig. 3a). *AtpA* and *orf522*, used as probes, hybridise to the same fragment when sunflower total DNA is digested either by *EcoRI*, *EcoRV* or *HindIII*, with the hybridisation fragment sizes being respectively 3.8 kb, 5.3 kb and 9 kb. When the RFLP analysis was done on the 411 cybrid clone, with the *atpA* or *orf522* as probe, the tested plants exhibited different patterns, indicating that this region was on the way of a rearrangement from the sunflower *atpA-orf522* sequence. When total DNA from I₄₁₁ plants were digested with *EcoRI* or *HindIII*, the plants e, f, h, l exhibited the chicory and the sunflower *atpA* fragments (data not shown). They also exhibited the *orf522* sunflower fragment (fig. 4a, 4c). After *EcoRV* digestion (fig. 4b), those plants hybridised the *atpA* and *orf522* probes on the same 7 kb fragment. This fragment is larger than the 5.5 kb fragment observed in sunflower. When total DNAs were digested by *EcoRI* or *HindIII* (fig. 4a, 4c), the other I₄₁₁ plants (c, d, g, i, j, k), exhibited the chicory *atpA* gene (data not shown) and hybridised the *orf522* probe on fragments different from the sunflower one, 2.8 kb and 8.5 kb respectively. With *EcoRV*, those plants exhibited two hybridisation fragments of 5 kb and 7.5 kb.

All the 523 plants (I₅₂₃ and V₅₂₃) and V₄₁₁ plants exhibited a pattern identical to I_{411 c, d, g, i, j, k} plants. The 411 and 523 cybrids, when total DNAs were digested with *BamHI* restriction enzyme and hybridised with *orf522* probe, always showed the 2.3 kb fragment characteristic of male sterile sunflower (fig. 4d). The hypothesis suggesting that the sunflower *atpA-orf522* fragment introduction in the 411 cybrid and a progressive sunflower *atpA* gene elimination was verified. Thus the *orf522* sequence was retained in the 411 and 523 cytoplasms through generations. Now the 411 and 523 cybrids, backcrossed over 5 generations with witloof chicories, all present the same pattern, indicating that stability seems to be achieved in this region. Because the 411 and 523 cytoplasms do not have the *atpA* sunflower gene, and a 800 bp was amplified from some 411 and 523 cybrid clone plants, we wanted to understand the origin of the 800 bp fragment. This amplification fragment was sequenced. It contains the sequence of the 5' PCR primers immediately followed by the 265 bp inverted repeated sequence, found between *atpA* and *orf522*, also found downstream the *cob* sunflower gene (Laver *et al.*, 1991), and finally the total *orf522* sequence (fig. 3b). The 265 bp repeated sequence is thought to have played a role in the insertion and inversion sequence in sunflower (Laver *et al.*, 1991) and in some rearrangements in another sunflower cytoplasm (Spasova *et al.*, 1994). The sequence analysis suggests that, in the 411 cybrid, the sunflower *atpA* gene was eliminated whereas the entire *orf522* sequence was kept together with the 265 bp characteristic of the sunflower repeat. These results all together show that the *orf522* sequence was conserved but modifications occurred 5' to the 265 bp sequence.

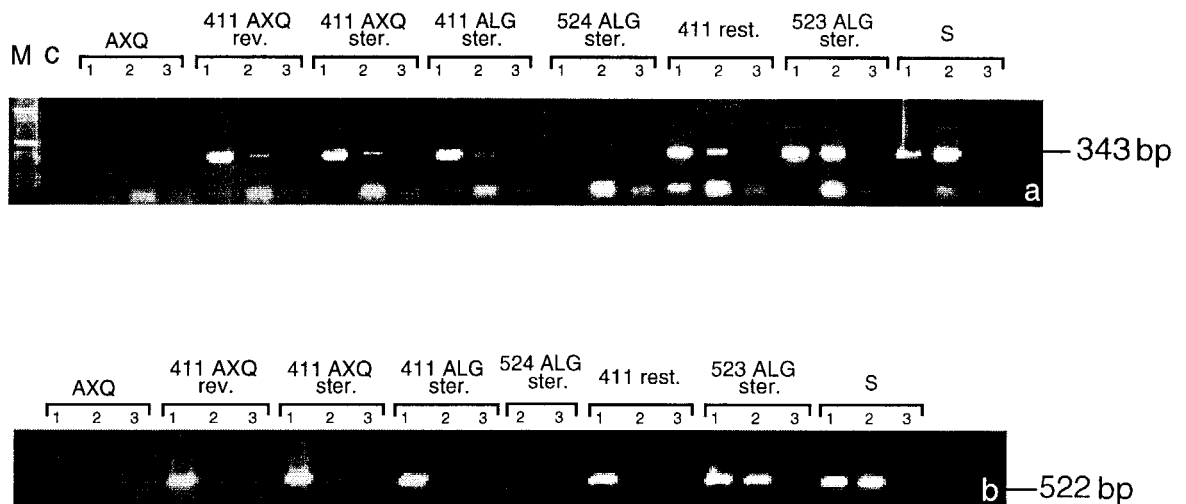


Fig. 5 a, b: PCR detection of the *orf522* transcript. Lanes c contain the control reaction without substrate. AXQ indicates the fertile chicory control, S indicates the CMS sunflower control, 411 AXQ indicates 411 cybrid siblings either sterile (ster.) or fertile (rev.) backcrossed with AXQ pollinator, 411 ALG, 523 ALG, 524 ALG indicate respectively a 411, 523, 524 cybrid plant, sterile, backcrossed with ALG pollinator. 411 rest. indicates a 411 cybrid plant restored with the Jupiter pollinator. M indicates the molecular weight marker; a 1 kb ladder (BRL). For each plant, the PCR reaction is performed using DNA (1), cDNA (2), RNA not treated with reverse transcriptase (3).

a: Amplification reactions were performed using primers C and E.

b: Amplification reactions were performed using primers D and F.

RFLP analyses were performed comparing 411 sterile, revertant and restored cybrids, AXQ pollinator and CMS sunflower patterns obtained either after *atpA* or *orf522* hybridisation. With *atpA* and *orf522* probes, no difference could be observed between the 411 sterile, revertant and restored cybrids, all these plants presenting the same pattern (described above for V₄₁₁ plants), different from the sunflower one (data not shown). This result shows that the 411 mitochondrial genome stabilised the same way in the *orf522* region independently of the nuclear context, as it has already been observed for other mitochondrial genes (Dubreucq *et al.*, in preparation). Interestingly, not only the 411 revertant cybrid hybridised the *orf522* sequence, but the hybridisation fragment was identical to that observed for 411 CMS or restored plants. This result shows that the mitochondrial structure in the *orf522* region is identical for the 411 sterile and revertant plant, as a point mutation is unlikely to occur. This result suggest that *orf522* may not be responsible for CMS in the 411 cybrid.

Expression of the orf522 in the 411 and 523 chicory cybrids:

Because the 411 and 523 cybrids do not have the complete sunflower *atpA* gene upstream of *orf522*, we wanted to know whether *orf522* was expressed or not. A first RT-PCR was performed as a positive control, using oligonucleotides A and B, hybridising respectively the 5' and 3' *atpA* gene ends, to determine whether conditions were appropriate for RT-PCR amplification. For all plant tested, control samples where reverse transcriptase was omitted were included, ensuring that the amplification obtained in RT-PCR reactions was from cDNA and not from contaminating mtDNA. As a further comparison, a PCR on DNA was included in the experiment. All the plants analysed amplified the *atpA* gene confirming the expression of this gene. When RT-PCRs were performed using oligonucleotides hybridising the 5' and 3' *orf522* ends, different levels of amplification were observed (fig. 5a, 5b). The Fertile AXQ chicory and the 524 CMS cybrid did not amplify *orf522* as expected from the results obtained on mtDNA. The CMS sunflower and the 523 CMS cybrid amplified the *orf522* sequence at a similar level from cDNA as from DNA. Finally, plants with the 411 cytotype amplified the *orf522* from their cDNA more faintly than from DNA whatever their phenotype (sterile or fertile) or nuclear background (fig. 5).

To verify those results, a northern blot, using the same RNA samples, was hybridised with *atpA* and *orf522* sequences (fig. 6). mRNA from the fertile witloof AXQ chicory, the 411 AXQ revertant, the 411 AXQ CMS, the 411 ALG CMS and the 524 CMS chicories hybridised to the *atpA* probe with different intensities. The 411 restored cybrid hybridised to the *atpA* probe as a smaller RNA. The 523 cybrid chicory presented two hybridisation signals with the smaller RNA giving a stronger signal than the larger one. The nature of the explant and the development stage (buds or seedlings) of the plant used for the RNA extraction, may be one of the factors explaining the different intensities of the fragment observed. Actually tissue and developmental regulation of

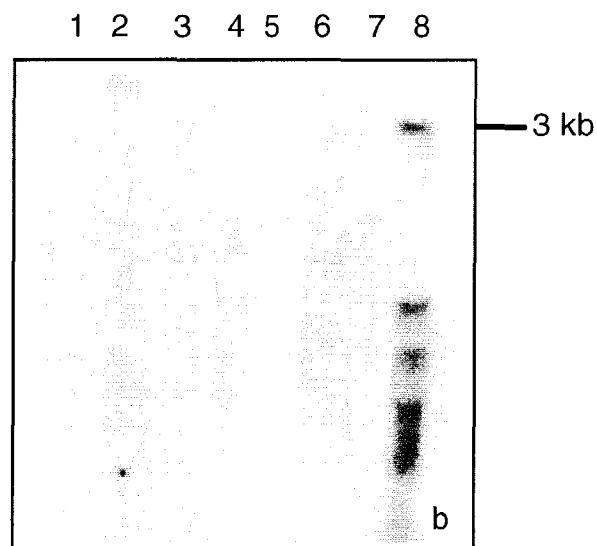
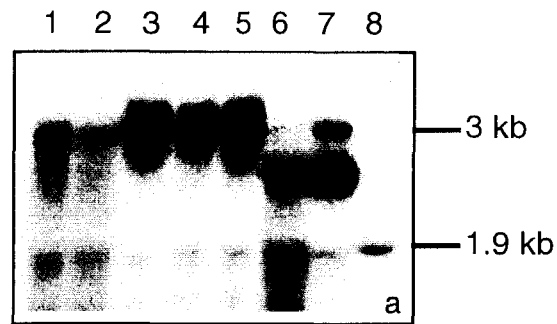


Fig. 6 a, b: RNA gel blot analysis: fertile AXQ chicory (1); 411 revertant cybrid backcrossed with AXQ pollinator (2); 411 sterile cybrid backcrossed with AXQ pollinator (3); 411 sterile cybrid backcrossed with ALG pollinator (4); 524 sterile cybrid backcrossed with ALG pollinator (5); 411 fertile cybrid restored with the Jupiter pollinator (6); 523 sterile cybrid backcrossed with ALG pollinator (7); CMS sunflower (8)
a: RNA gel blot analysis performed using *atpA* probe
b: RNA gel blot analysis performed using *orf522* probe.

the mitochondrial gene expression has been investigated (Binder *et al.*, 1996). This regulation can induce variations in mRNA abundance. Concerning the hybridisation with the *orf522* sequence used as probe, only CMS sunflower gave a signal. The other plants, including the 523 CMS cybrid analysed yielded no signal (fig.6b).

Discussion

CMS chicories were obtained after protoplast fusions between fertile chicories and CMS sunflowers. Our aim was to determine whether the CMS determinant of sunflower was present in the sterile chicory cybrids and if we could establish its responsibility in the CMS of these plants. Our results showed that the protoplast fusion led to three different cytoplasms with respect to the *orf522* region: the 411 cytoplasm received the *atpA-orf522* sunflower fragment after protoplast fusion, the 523 cytoplasm only showed the *orf522* fragment and the 524 mtDNA never hybridised, nor amplified, the *orf522* gene. This study shows that the 524 cybrid does not contain the *orf522* sequence in its mitochondrial structure. From this result, we can say that 524 cybrid represents a novel CMS, different from the sunflower CMS. On the contrary, 411 and 523 cybrids received the *orf522* sequence. The 411 cybrid received the entire *atpA-orf522* fragment during protoplast fusion as demonstrated by the 2.2 kb fragment obtained for I_{411 e, f, h, l} plants after PCR amplification. From the results obtained after *atpA-orf522* PCR amplification and with *atpA* and *orf522*, used as probe, in the RFLP analyses, we could make two hypotheses: i) A heteroplasmic situation could have been maintained during a few generations after protoplast fusion. The I_{411 e, f, h, l} plants, presenting both *atpA* parental genes, and the *orf522* sequence could correspond to plants bringing together the chicory and the sunflower mitochondrial genomes. In such a case, the other I₄₁₁ plants could correspond to the first plants analysed just after the segregation of the sunflower mtDNA structure. It induced both the segregation of the second *atpA* gene and the *orf522* introduction into the chicory mitochondrial genome. It is likely that a heteroplasmic situation existed after protoplast fusion, but the polymorphism observed in the I₄₁₁ plants can not be understood as heteroplasmy because, when RFLP analyses were performed with other mitochondrial probes, such as *coxI*, *atp9* or *coxIII* (Dubreucq *et al.*, submitted), the results showed that only one copy of each gene studied was present in the I₄₁₁ mitochondrial genomes. ii) We are however more in favour with the hypothesis that at least the *HindIII* sunflower fragment was directly introduced into the 411 CMS chicory mitochondrial genome. The patterns obtained for 411 and 523 cybrids, after *BamHI* digestion and *orf522* hybridisation, show that the 2.3 kb fragment, in the *orf522* 3' end, is identical in the 411 and 523 cybrids to the *orf522* 3' end observed in CMS sunflower. This result shows that recombination events occurred in the *orf522* 5' region leaving the 3' region unchanged. Thus a recombination event between the *HindIII* 5' site and the *EcoRV* 5' site of sunflower, hybridising

the *orf522* sequence, could have occurred in the chicory mitochondrial genome, creating a larger *EcoRV* hybridisation fragment in the 411 cybrid. Then, the mitochondrial genome seems to have rearranged, progressively eliminating the sunflower *atpA* gene. This was shown by the presence of the 800 bp fragment amplification and the loss of the sunflower *atpA* fragment. In the 523 cybrids, the sunflower *atpA* gene was never observed. We do not know whether this cybrid eliminated the sunflower *atpA* gene rapidly after receiving the *atpA-orf522* sunflower sequence, so that it was never detected, or, whether only the *orf522* sequence was introduced into that mitochondrial genome. It is possible that the 411 and 523 cybrids have undergone the same events but at different rates. They do however display identical hybridisation patterns with the *orf522* probe. For the $I_{411\ c}$, I_{523} , V_{411} and V_{523} plants, two hybridisation fragments with *orf522*, after *EcoRV* digestion, could be observed (instead of one fragment in CMS sunflower). The 411 and 523 cybrids most probably carry one *orf522* gene because only one hybridisation fragment could be observed with all the other restriction enzymes used. An *EcoRV* restriction site could have been created inside the *orf522* gene by recombination events, but this is not the case because when *orf522* PCR amplification fragments were digested with *EcoRV*, no digestion occurred (data not shown). Thus we suppose that the 5' region of the *orf522* gene is involved in recombination through large repeated sequences, different from the sunflower 265 bp repeat, in the 523 and 411 characteristic sequence. Isomerisation of these repeated sequences would lead to two different 5' unique regions beyond the repeated sequence. The two *EcoRV* 5' sites detected by hybridisation experiments could be each of the 5' unique regions whereas the other enzymes used (*HindIII*, *EcoRI*, *BamHI*) would have sites inside the repeated sequence and thus would not reveal this isomerisation by hybridisation with the *orf522* probe. When the 800 bp fragment was sequenced, this fragment did not contain *atpA* sunflower gene. This result was confirmed when we compared fragment length between 411 cybrid that contained *atpA* sunflower gene and 411 cybrid having lost that gene, after *EcoRI*, *HindIII* digestion and *orf522* hybridisation, we could verify that fragment lengths, for cybrid without *atpA* sunflower gene, were approximately 1.5 kb smaller than the fragment length when *atpA* sunflower gene was still present, this difference corresponding to *atpA* gene length. We note that, the first 9 bp, 3' to the primer sequence, of the 800 bp amplification fragment are repeated in the sunflower *atpA-orf522* locus. One repeat is downstream the primer sequence and one is at the beginning of the 265 bp repeated sequence. This direct repeated sequence could be involved in the *atpA* sunflower elimination, despite the fact it is very small. We could rule out the possibility that this recombination event occurred *in vitro* during the PCR amplification. This could be clarified by direct cloning of the new *orf522* region. From the results obtained by RFLP analysis, the *atpA* sunflower gene was effectively lost in 411 cybrid and the *orf522* 5' border was rearranged.

Because of the results obtained regarding the presence of the *orf522* and its linkage with the *atpA* gene, we investigated its expression in the 411 and 523 cybrids. RT-PCR and northern hybridisation analyses give information on the RNA accumulation level and not on the transcription rate. For the 411 cybrid, a very weak *orf522* transcript accumulation can be detected by RT-PCR. No difference could be observed between the 411 male sterile, restored and revertant plants concerning mitochondrial structure in the *atpA* and *orf522* vicinity. The 411 restored and male sterile cybrids show the same weak signal after RT-PCR amplification. In sunflower, restoration genes effects are detected at the post-transcriptional level, destabilising the *atpA-orf522* transcript only in male florets. It is unlikely that *orf522* induces CMS in 411 cybrid because: i) The weak *orf522* transcript accumulation level observed after RT-PCR amplification is identical in sterile, revertant and restored 411 cybrid florets. ii) The 411 revertant plants show that the *orf522* sequence is present and expressed at the same level. iii) The level of expression of the *orf522* gene, although detectable by RT-PCR experiments, is very weak, and corresponding mRNAs were never detected in northern experiments. Concerning the 523 cybrid, which presents a stronger RT-PCR *orf522* amplification signal, we might expect the *orf522* to be expressed at the same level as in the CMS sunflower. However, a mRNA for the *orf522* gene was never detected on the northern blot. In both the 411 and 523 cybrids, the *orf522* transcription must initiate at a different site from the one used in CMS sunflower, because the *atpA* sunflower gene is not present in those mitochondrial genomes. We can conclude with certainty that *orf522* is not responsible for CMS in 524 cybrid. It is interesting to note that the *orf522* gene has different status in the three cybrids. The gene is not present in the 524 cybrid. It is present in the 411 and 523 cybrids with new 5' regions but with different level of expression as observed in the RT-PCR experiments. Furthermore, the three cybrids are all restored by the same pollinator, suggesting a similarity in the sterility inducer. All these observations together lead us to conclude that the responsibility of the *orf522* gene in the male sterility of the chicory cybrids is very unlikely.

A new way is opened to the study of the CMS chicory determinism. A smaller mRNA, corresponding to *atpA* expression, in 411 restored cybrid suggests that *atpA* could be involved in the male sterility mechanism. A transcriptional effect of the restorer genes could be suggested and as no differences have been observed between fertile and sterile 411 AXQ plants, a post-transcriptional mechanism of sterility can be hypothesised. These are preliminary results but might lead to new investigations.

Because CMS chicories present a lot of mitochondrial rearrangements (*atpA*, *atp6*, *coxII*, *cob*, *rrn18*, *rrn26*, *orf522*, Dubreucq *et al.*, submitted), we are now studying mitochondrial protein profiles by *in organello* synthesis, aiming to observe if there are differences in the protein profiles between revertant, sterile and restored cybrids.

Acknowledgements: We thank W. Hauswirth for providing the *atpA* gene probe and C.J. Leaver for providing the *orf522* gene probe, the INRA for providing pollinators seeds, the Etablissements Florimond-Desprez for providing the sunflower seeds. We are so grateful to L. Boulidard for his enormous work in backcrosses and obtaining restorers. This work was supported by INRA and Région Nord Pas de Calais.

We declare that the experiments comply with the current laws of France in which the experiments were performed.

References

- Bellamy A., Vedel F., Bannerot H. (1996). Varietal identification in *Cichorium intybus* L. and determination of genetic purity of F1 hybrid seed samples based on RAPD markers. *Plant Breeding*. 115, 128-132
- Binder S., Marchfelder A., Brennicke A. (1996). Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant. Mol. Biol.* 32, 303-314
- Bonen L., Brown G.G. (1993). Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organisation and expression in plant mitochondria. *Can. J. Bot.* 71, 645-660
- Dean C., van den Elzen P., Tamaki S., Dunsmuir P., Bedbrook J. (1985). Differential expression of the eight genes of the *Petunia* ribulose biphosphate carboxylase small subunit multi-gene family. *EMBO J.* 4, 3055-3061
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1, 19-21
- He S., Yu Z.H., Vallejos C.E., Mackenzie S.A. (1995). Pollen fertility restoration by nuclear gene *Fr* in CMS common bean: an *Fr* linkage map and the mode of *Fr* action. *Theor. Appl. Genet.* 90, 1056-1062
- Köhler R.H., Horn R., Lössl A., Zetsche K. (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 227, 369-376
- Krishnasamy S., Makaroff C.A. (1993). Characterisation of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relation with male sterility in *Ogura* radish. *Curr. Genet.* 24, 156-163
- Laver H.K., Reynolds S.J., Moneger F., Leaver C.J. (1991). Mitochondrial genome organisation and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J.* 1, 185-193
- Monéger F., Smart C.J., Leaver C.J. (1994). Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. *EMBO J.* 13, 8-17
- Muise R.C., Hauswirth W.W. (1992). Transcription in maize mitochondria: effects of tissue and mitochondrial genotype. *Curr. Genet.* 22, 235-242
- Rambaud C., Bellamy A., Dubreucq A., Bourquin J.-C., Vasseur J. (1997). Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from cytoplasmic male sterile chicory cybrid. *Plant Breeding*. 116, 481-486
- Rambaud C., Dubois J., Vasseur J. (1993). Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 87, 347-352
- Sanger F., Nicklens S., Coulson A. M. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5436-5437

- Spasova M., Monéger F., Leaver C.J., Petrov P., Atanassov A., Nijkamp H.J., Hille J. (1994). Characterisation and expression of the mitochondrial genome of a new type of cytoplasmic male-sterile sunflower. *Plant Mol. Biol.* 26, 1819-1831
- Tang H.V., Pring D.R., Shaw L.C., Salazar R.A., Muza F.R., Yan B., Schertz K.F. (1995). Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. *Plant J.* 10, 123-135
- Vedel F., Pla M., Vitart V., Gutierrez S., Chétrit P., De Paepe R. (1994). Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 601-618

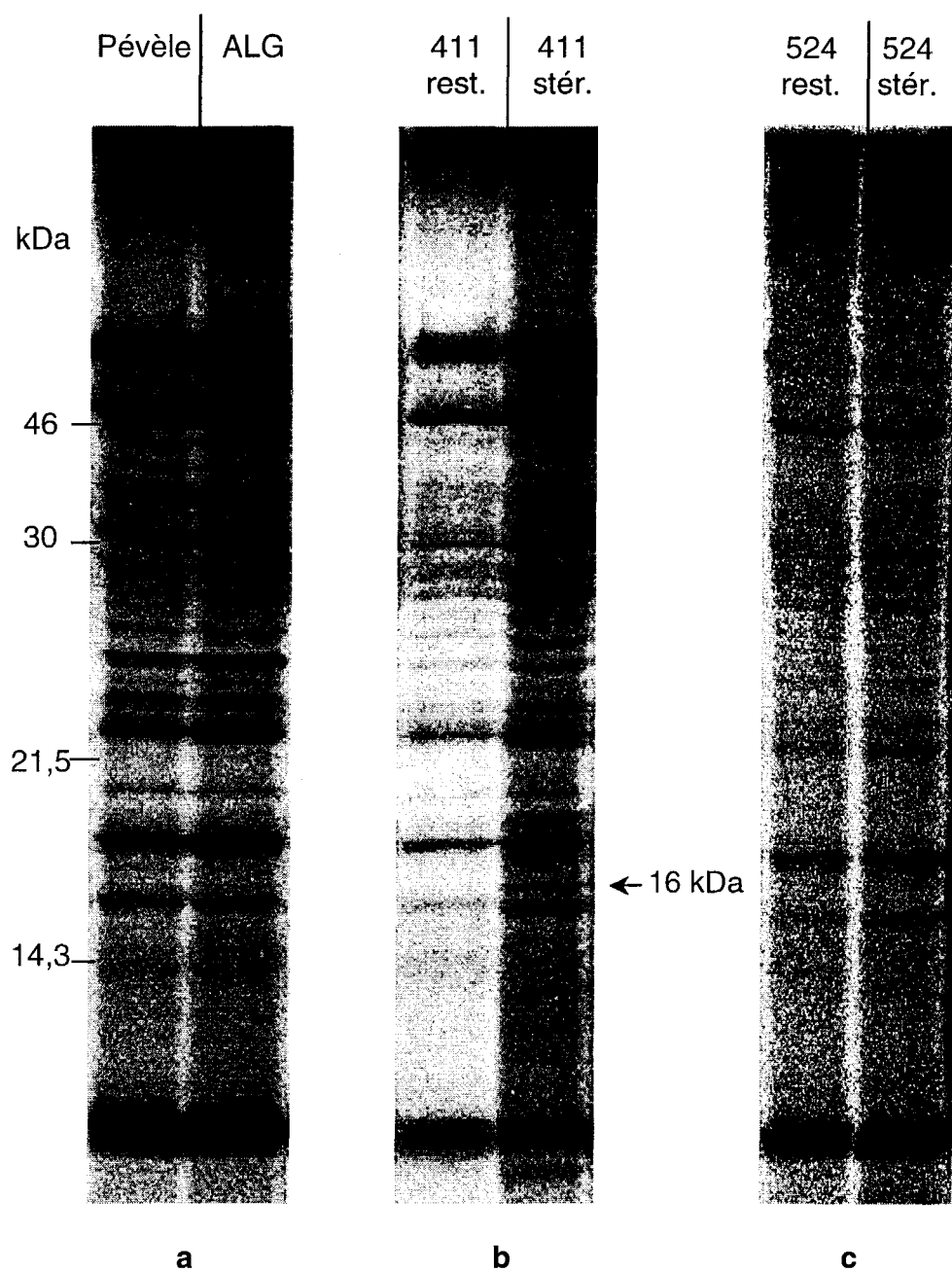


Figure 13 a, b, c: Comparaison des profils protéiques obtenus en synthèse *in organello*
a : Chicorées témoins fertiles: chicorée industrielle Pévèle et chicorée endive ALG.
b : Cybrides 411 restaurés par Jupiter puis en ségrégation vis à vis de la stérilité mâle après croisements par la lignée AXQ.
c : Cybrides 524 restaurés par Jupiter puis en ségrégation vis à vis de la stérilité mâle après croisements par la lignée AXQ.

3.2.1. Résultats complémentaires - Synthèses *in organello*

Afin de déterminer, si l'apparition de la smc chez nos trois cybrides peut être corrélée à une modification au niveau de la synthèse protéique mitochondriale, des synthèses *in organello* ont été réalisées. Tout d'abord, il convient de préciser que le matériel utilisé ne présente pas l'homogénéité que nous aurions souhaité. En effet, tout comme chez le tournesol, les chicorées, présentent des inflorescences en capitule. Au sein de ce capitule, les études cytologiques préliminaires, réalisées sur des chicorées fertiles (Berthe B., 1997), ont montré que les fleurons qui composent le capitule présentent des stades de développement différents en fonction de leur position sur l'inflorescence. Dans un même capitule, un fleuron situé à l'extérieur du bouton inflorescentiel présente un stade télophase de la microsporogénèse, alors qu'un fleuron situé dans la partie centrale du capitule présente un stade métaphase. On peut donc penser que si les stades cytologiques sont différents, l'activité métabolique peut également être différente. Comme les synthèses *in organello* requièrent une quantité importante de matériel pour parvenir à l'extraction d'une quantité suffisante de mitochondries, les extractions de mitochondries ont été effectuées à partir d'un grand nombre de boutons inflorescentiels, dont la taille était comprise entre 2 mm et 5 mm de diamètre.

Une comparaison du profil protéique mitochondrial de la chicorée industrielle Pévèle avec celui de la chicorée endive ALG ne montre pas de différence (fig. 13a). Ces plantes sont très proches phylogénétiquement puisque ce sont deux *Cichorium intybus* L. var. witloof pour ALG (chicorée endive) et var. Magdebourg pour Pévèle (chicorée industrielle) et ce résultat n'est donc pas surprenant.

Nous avons également pu effectuer une comparaison entre les profils protéiques mitochondriaux de deux cybrides 411 restaurés par Jupiter (après trois croisements successifs) et croisés deux fois par Rub (fig. 13b). La F_2 , ainsi obtenue avec Rub, étant en disjonction, une plante fertile et une plante stérile de la F_2 ont été comparées. Une protéine, dont la taille est estimée à environ 16 kDa, est présente chez le cybride stérile mais absente chez le cybride fertile. Il semble que cette protéine ne soit pas présente non plus chez nos témoins fertiles ALG et Pévèle.

La même comparaison a été réalisée avec des cybrides ayant subi les mêmes croisements (restauration avec Jupiter, puis croisement avec Rub) mais, cette fois, dans le contexte cytoplasmique 524 (fig. 13c): la F_2 , également en disjonction (stérile : fertile) n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre le cybride 524 stérile et le cybride 524 fertile.

3.2.2.Discussion

Le but de nos analyses était de comprendre le déterminisme moléculaire de la smc de la chicorée. L'analyse RFLP a permis de mettre en évidence trois cytoplasmes différents, mais c'est surtout l'analyse de l'expression qui nous permettra de déterminer plus précisément l'origine des stérilités mâles observées.

Il convient d'être extrêmement prudent quant à l'observation des résultats obtenus en synthèse *in organello*. Il faudra réitérer les expériences afin de vérifier les résultats. D'autres synthèses *in organello* ont été effectuées, mais la complexité des profils obtenus ne nous a pas permis de les interpréter. Il faudra à l'avenir, effectuer en parallèle des synthèses *in organello* en présence soit d'acétate (substrat uniquement utilisable par les bactéries) soit d'ATP (substrat utilisable par les bactéries et par les mitochondries) afin de pouvoir écarter les profils dans lesquels une contamination bactérienne est présente. En effet, pour les profils très complexes obtenus, en l'absence du contrôle bactérien, nous pouvons émettre différentes hypothèses: contamination bactérienne, superposition d'une synthèse bactérienne et d'une synthèse mitochondriale, synthèse mitochondriale avec produits de dégradation protéique, profil protéique mitochondrial complexe. D'autre part, une synthèse *in organello* à partir de jeunes germinations de tournesol mâle stérile a été réalisée mais l'absence de profil protéique mitochondrial de tournesol fertile ne nous a pas permis de localiser avec certitude la protéine de 15 kDa, impliquée dans l'apparition de la smc-PET1, présente chez les tournesols stériles mais absente chez les tournesols fertiles. Nous ne pouvons donc pas comparer la taille de la protéine détectée chez le cybride 411 stérile avec la protéine de 15 kDa induisant la smc chez le tournesol. Il faudra donc refaire des synthèses *in organello* en utilisant de nombreux contrôles et en essayant autant que possible de déposer des quantités identiques de produits de synthèse. Il est possible, en effet, que les différences entre chicorées stériles et fertiles se situent à un niveau quantitatif et non à un niveau qualitatif.

Il faut avoir présent à l'esprit que les génomes mitochondriaux des cybrides 411 et 523 ne présentent pas le gène *atpA* du tournesol, à partir duquel l'*orf522* est transcrit chez le tournesol. Si la séquence *orf522* est transcrite chez ces deux cybrides, la transcription doit être initiée à partir d'un autre site d'initiation de transcription qui sera à déterminer dans ce cas. Le faible signal d'amplification du messager *orf522* obtenu en RT-PCR pour les cybrides 411 et l'absence de signal d'hybridation de l'*orf522* en northern peut signifier soit que l'*orf522* est transcrit mais que le messager est dégradé, comme cela a été constaté dans la smc Ogu-INRA des colzas (Bellaoui *et al.*, 1997), soit que la transcription est très faible. Par contre, la différence d'amplification de l'*orf522* en RT-PCR entre le cybride 523 et le cybride 411 est difficile à expliquer. En effet, les hybridations des Southern avec la sonde *orf522* ont

donné les mêmes résultats quelles que soient les enzymes de restriction utilisées. Ceci suggère que les régions du génome mitochondrial situées en 5' et 3' de la séquence *orf522* sont identiques et que si un site d'initiation de transcription proche de la séquence *orf522* existe, il est probable qu'il soit identique dans les deux cytotypes. Un séquençage des régions 5' et 3' de l'*orf522* permettrait de le vérifier. L'absence de signal d'hybridation en northern alors que les résultats de RT-PCR semblent indiquer une activité de transcription peut également être interprétée comme résultant d'une action post-transcriptionnelle de gènes nucléaires de chicorée sur l'expression de l'*orf522*.

Les résultats similaires, obtenus pour les cybrides 411 stériles, révertants et restaurés, sur l'expression de l'*orf522* suggèrent qu'il n'est certainement pas responsable de l'apparition de la smc chez les cybrides 411. Cette hypothèse ne rejette pas la possibilité pour *orf522* d'être transcrit, mais dans ce cas, l'expression de l'*orf522* n'est pas liée à l'apparition de la smc dans les cybrides 411. D'autre part, si l'hypothèse d'une transcription de l'*orf522* suivie d'une dégradation se confirme, il est vraisemblable que la protéine d'environ 16 kDa présente chez les plantes 411 stériles et absente chez les plantes 411 fertiles, ne corresponde pas à un produit d'expression de la séquence *orf522*. L'observation simultanée des profils des différents cybrides avec les profils des tournesols fertiles et stériles permettra de comparer la taille de la protéine de 16 kDa à la protéine ORF522. Dans l'hypothèse où la protéine, détectée chez les cybrides 411 stériles, correspondrait à l'ORF522, l'utilisation d'anticorps, dirigés spécifiquement contre l'ORF522, permettrait de localiser son expression dans les chicorées mâle stériles.

La présence du gène *atpA* du tournesol n'était pas l'élément induisant la smc dans les chicorées 411 puisque sa disparition n'a pas entraîné un retour vers la fertilité dans ces cybrides. Il aurait été possible que le polypeptide correspondant à la séquence du gène *atpA* du tournesol entre en compétition avec la sous-unité α de complexe atpasique de la chicorée, la présence de la sous-unité α du tournesol dans les complexes enzymatiques de chicorée rendant l'ATPase moins fonctionnelle et ainsi induisant une carence au niveau de la production d'ATP ressentie principalement au moment de la microsporogénèse.

Puisque nous disposons maintenant de plantes 411 révertantes, il serait intéressant d'effectuer une extraction d'ADNmt. En effet, une comparaison des profils d'ADNmt d'une plante révertante avec son équivalent mâle stérile pourrait permettre de localiser la région de l'ADNmt s'étant remaniée. La détection de cette région serait précieuse pour trouver le(s) déterminant(s) de la smc chez les plantes 411.

Il est possible que les trois cybrides présentent trois smc différentes. Toutefois, puisque c'est le même pollinisateur qui restaure les 3 cybrides, même si ces smc présentent potentiellement des différences, elles doivent présenter des caractères communs. Il est en effet très improbable que le même pollinisateur possède des gènes nucléaires différents restaurant des smc totalement différentes. Même si ce n'est pas l'*orf522* qui est responsable de la smc pour 411 et 523, il est intéressant de noter que cette séquence s'est maintenue dans leur génome mitochondrial.

Enfin, il sera intéressant de continuer l'analyse de l'expression du génome mitochondrial. Il est possible que parmi les sondes mitochondriales, utilisées en RFLP, une sonde permette de mettre en évidence des différences au niveau de l'accumulation ou de la taille d'un ARNm chez les plantes restaurées. Un tel résultat permettrait d'avoir un candidat potentiel du déterminisme de la smc.

Conclusion Générale - Perspectives

4. Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de déterminer que le cytoplasme 524 ne possède pas la séquence *orf522*. Le cytoplasme 411, qui présentait la séquence *atpA-orf522* du tournesol, a perdu le gène *atpA* du tournesol pour ne plus conserver que l'*orf522* ainsi que la portion d'ADNmt du tournesol étant comprise entre l'*orf522* et le gène *atpA*. Le cytoplasme 523 possède l'*orf522*, mais le gène *atpA* du tournesol n'a jamais été détecté.

Au début de ce travail, les génomes mitochondriaux présentaient un fort polymorphisme dans la longueur des fragments de restriction. L'analyse RFLP nous a permis de constater que les trois génomes mitochondriaux évoluent vers une stabilisation presque totale et que cette stabilisation n'est pas influencée par le noyau puisque aucune différence n'a pu être mise en évidence pour un cytoplasme donné dans différents contextes nucléaires. La stabilisation ne s'est pas accompagnée d'une perte du/des déterminant(s) entraînant la smc. Toutefois, il n'est pas impossible que nous ayons exercé une sélection au cours des générations en faveur d'un maintien de ces déterminants. En effet, il était techniquement impossible de conserver toutes les plantes obtenues à chaque génération et de toutes les rétrocroiser, la quantité de matériel devenant trop importante. Les plantes issues de rétrocroisements ont donc été sélectionnées en fonction de leur fertilité/stérilité mâle et en fonction de leur valeur agronomique.

Dans les trois cytoplasmes, on peut observer des fragments de restriction identiques à ceux observés chez le tournesol et des fragments de restriction nouveaux. Ces fragments sont maintenus au cours des générations. Une portion du génome mitochondrial du tournesol a donc été introduite de façon stable dans nos trois cybrides. Les génomes mitochondriaux ont également subi des remaniements créant des nouvelles molécules d'ADNmt qui sont transmises de génération en génération.

Nous avons également pu constater que les génomes mitochondriaux des trois cytoplasmes sont différents mais qu'ils présentent des traits communs, correspondant à des régions nouvelles issues de remaniements, à des régions caractéristiques de la chicorée fertile ou caractéristiques du tournesol mâle stérile.

La stabilisation des trois génomes mitochondriaux s'est accompagnée d'une stabilisation de la morphologie florale dans un contexte nucléaire donné et l'utilisation de

Jupiter, comme pollinisateur, nous a permis de constater que son noyau présente des gènes de restauration pour les trois cytoplasmes.

Les cybrides 411, 523 et 524 présentent des caractéristiques agronomiques différentes des plantes fertiles témoins. Cette observation nous permet de conclure que les trois cytoplasmes ont non seulement une influence sur le développement du pollen mais également une influence sur l'ensemble des processus physiologiques de la plante qui les porte. D'autre part, la comparaison de plantes présentant un même cytoplasme placé dans différents contextes nucléaires, nous a permis de mettre en évidence la relation étroite existant entre le cytoplasme et le noyau, puisque ces plantes présentaient des caractéristiques différentes (présence ou non d'anthère, problème de fertilité femelle...). Dans un même contexte nucléaire, les trois cytoplasmes induisent également des caractéristiques agronomiques différentes. Ces résultats indiquent que les trois cytoplasmes ont des influences différentes sur la physiologie des plantes.

L'absence de signal d'hybridation sur les northern avec la sonde *orf522* indique que le messenger *orf522* ne s'accumule pas chez les cybrides 411 et 523. Le signal obtenu en RT-PCR peut s'expliquer par la présence de quelques transcrits *orf522* qui n'ont pas encore été dégradés, ces transcrits étant présents en quantité trop faible pour être détectés sur les northern. Mais dans le cas d'une dégradation des transcrits *orf522*, la protéine de 16 kDa observée dans les profils protéiques mitochondriaux ne correspond pas à la protéine ORF522 du tournesol mâle stérile.

La smc des cybrides 524 n'est pas due à l'*orf522* puisque cette séquence n'a pas été transférée. Pour les cybrides 411, il est vraisemblable que l'*orf522* ne soit pas le déterminant de la smc. Les résultats obtenus pour les cybrides 411, après hybridation des ARNm par la sonde *atpA*, suggèrent que la smc pourrait être induite par un mécanisme post-transcriptionnel au niveau de l'expression du gène *atpA* et que les gènes de restauration de Jupiter agiraient au niveau de l'expression de ce gène. Pour les cybrides 523, les résultats obtenus en northern semblent également rejeter l'hypothèse de la responsabilité de l'*orf522*. La smc des chicorées est peut-être provoquée par l'expression de gènes obligatoires du tournesol ou par l'expression d'une ORF présente chez le tournesol mais non exprimée dans un contexte nucléaire de tournesol induisant des dysfonctionnements dans les cellules de chicorées. On ne peut pas non plus rejeter l'hypothèse de l'existence d'une nouvelle séquence chimérique, créée par des recombinaisons entre les génomes mitochondriaux de la chicorée et du tournesol, qui serait exprimée et induirait la smc dans la chicorée.

Il est possible que les déterminants induisant la smc dans les trois cytotypes soient identiques. La restauration de leur fertilité par le même pollinisateur, Jupiter, est en accord

avec ce résultat. Cependant les ségrégations différentes obtenues pour les cybrides 411 et 524 restaurés puis recroisés par un mainteneur de stérilité, semblent indiquer des différences au niveau des déterminants induisant la sm dans les cytoplasmes 411 et 524.

5. Perspectives

Dans le but d'identifier les déterminants induisant la smc chez les cybrides 411, 523 et 524, il faudra réaliser de nouvelles synthèses *in organello*. Celles-ci permettront éventuellement de détecter la présence d'une ou de plusieurs nouvelles protéines, caractéristiques des cybrides mâle stériles. Ces protéines pourront être identiques pour les trois cytoplasmes ou différentes. Si de telles protéines sont détectées chez les cybrides stériles, il faudra vérifier si leur synthèse est différente chez les cybrides restaurés. Une telle différence permettrait de confirmer leur rôle dans l'induction de la smc. Une analyse des profils de l'ADNmt des plantes 411 révertantes comparés aux profils des plantes 411 stériles pourra indiquer la région du génome mitochondrial ayant subi des réarrangements et ayant ainsi engendré la réversion vers la fertilité. Il serait également intéressant, pour les régions de l'ADNmt, présentant encore un léger polymorphisme de longueur de restriction, de vérifier, si à terme, ces régions vont se stabiliser. Enfin, l'analyse des profils d'expression en northern permettra peut-être de révéler des différences d'expression de certains gènes entre chicorées stériles et fertiles dans les trois cybrides.



Annexe

6. Annexe

Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from cytoplasmic male sterile chicory cybrid.

Rambaud C., Bellamy A., Dubreucq A., Bourquin J.-C., Vasseur J. (1997).

Plant Breeding. 116, 481-486

Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid

C. RAMBAUD¹, A. BELLAMY², A. DUBREUCQ¹, J.-C. BOURQUIN¹ and J. VASSEUR¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogénèse Végétales, USTL INRA, Bât. SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France; ²Station de la Fédération Nationale des Producteurs d'Endives, route de Cambrai, F-62000 Arras, France

With 5 figures and 2 tables

Received January 6, 1997; Accepted April 16, 1997

Communicated by T. Börner

Abstract

Cytoplasmic male sterile (CMS) chicory cybrids have previously been obtained by fusion between chicory and CMS sunflower protoplasts. Preliminary restriction fragment length polymorphism analysis has shown mitochondrial recombination events in CMS plants and their progeny. The aim of this study was to investigate the fate of the mitochondrial genome of the fourth progeny derived from one CMS cybrid. Southern hybridization using several specific mitochondrial sequences as probes have revealed polymorphic patterns between the plants analysed and, consequently, the genetic instability of this genome. Presence of the sequence responsible for cytoplasmic male sterility in sunflower (*orf522*) was detected by polymerase chain reaction and confirmed by molecular hybridization in the CMS chicory plants; however, its part in CMS expression in chicory did not appear obvious. Moreover, different flowering phenotypes, including completely fertile plants occurred and no correlation could be established between the different mitochondrial profiles and the flowering types. These results suggested some hypotheses and questions about the molecular determinant of CMS in chicory, its regulation and expression and questions about the mitochondrial-nuclear interactions.

Key words: *Cichorium intybus* — *Helianthus annuus* — *atpA* — cybrid — cytoplasmic male sterility — mitochondrial DNA rearrangement — *orf522*

Cytoplasmic male sterility (CMS) is expressed as a maternally inherited inability to produce functional pollen. This phenomenon has been found in many plant species (Hanson and Conde 1985, Braun et al. 1992) and is conveniently used for hybrid seed production. It can appear spontaneously or be induced by either intra- or inter-specific crosses or by protoplast fusion.

Molecular studies have revealed in many crops that CMS is generally associated with modifications in the mitochondrial genome organization arising from recombination events (Hanson 1991, Nair 1993). These recombinations could alter mitochondrial genes and lead to abnormal polypeptides or generate novel open reading frames (orfs). In maize, petunia (Nivison and Hanson 1989) and sunflower (Horn et al. 1991), specific CMS polypeptides encoded by these novel orfs have been identified. However, while genetic determinants of CMS appear to be located in the mitochondrial genome, it is also certain that the expression of CMS is controlled by nuclear genes (Newton 1988).

In *Cichorium intybus*, CMS plants were previously obtained by fusion between chicory and cytoplasmic male-sterile sunflower protoplasts. The cytoplasmic origin of this male sterility was confirmed by observation of flowering progenies. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) experiments with

several specific mitochondrial probes have revealed recombination events between mitochondrial DNAs of the two species fused (Rambaud et al. 1993). Complementary molecular analyses achieved with a small number of plants corresponding to the first, second and third generations of crosses have suggested the instability of the mitochondrial genome (Rambaud et al. 1994). While many authors have reported the genome organization of mitochondrial DNA in cybrid plants, its fate through their sexual progenies has been less thoroughly examined (Aviv and Galun 1987, Sakai and Imamura 1992, Akagi et al. 1995).

In this paper, we report the results of molecular investigation on the mitochondrial genome stability of progeny derived from one CMS chicory cybrid, after four sexual crosses with different pollinators. In addition, studies on the presence of the *orf522* sequence, responsible for the CMS in sunflower (Köhler et al. 1991, Laver et al. 1991) were undertaken in CMS chicory plants.

Materials and Methods

Plant materials: The fourth progeny of a male sterile cybrid, CT41/1 from protoplast fusion between industrial chicory and sunflower was used for the analysis of the stability of the male sterility and the mitochondrial genome. SBZ83 and Cassel are both industrial chicory varieties used as pollinators.

C. intybus L. cv. 'Magdebourg' and *Helianthus annuus* (CMS line), the two species that have been fused (Rambaud et al. 1993), were used as controls. Seeds were provided by Ets Florimond Desprez, Templeuve, France.

Mitochondrial genes: The mitochondrial genes used in this work are listed in Table 1. The CMS sunflower-specific sequence (*orf522*) was

Table 1: Mitochondria fragments containing genes

Gene	Origin	Name of clone	Fragment size and restriction enzyme	Reference
<i>orf522</i>	Sunflower	pBSKS	545 bp (<i>Sma</i> I and <i>Eco</i> RI)	Laver et al. (1991)
<i>coxII</i>	<i>Oenothera</i>	pBR322	2.3 kb (<i>Pst</i> I and <i>Eco</i> RI)	Hiesel and Brennicke (1983)
<i>atpA</i>	<i>Oenothera</i>	pBR322	3 kb (<i>Bam</i> HI)	Schuster and Brennicke (1986)
<i>cob</i>	<i>Oenothera</i>	pBR322	2.9 kb (<i>Hind</i> III)	Schuster and Brennicke (1985)

kindly provided by F. Monéger, Oxford University, UK and mitochondrial genes from *Oenothera* were used as probes. Fragments corresponding to mitochondrial genes were prepared for each plasmid by restriction enzyme digestion (Table 1).

Analysis of the mitochondrial DNA: Total DNAs were isolated from leaves of chicory and hypocotyls of sunflower according to the procedure of Dellaporta et al. (1983). Ten micrograms of DNA were digested with the restriction endonucleases *EcoRI*, *EcoRV* and *HindIII* (Boehringer Mannheim) in a 30-µl reaction volume. Restriction fragments were separated by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels in Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer. The 1 kb ladder (BRL, Bethesda, MD, USA) was used as the molecular weight standard. Total DNA restriction fragments were transferred from agarose to Biodyne A membranes as described by Sambrook et al. (1989). Prehybridizations and hybridizations were performed at 42 °C according to Anderson and Young (1985). The CMS sunflower-specific sequence (*orf522*), kindly provided by F. Monéger, and mitochondrial genes from *Oenothera* were used as probes. These were radiolabelled by random priming with the T7QuickPrime Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and purified by centrifugation through a Sephadex G-50 column (Pharmacia). Membranes were washed twice in 2 × standard saline citrate (SSC), 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 0.2 × SSC, 0.1% SDS at 42 °C. Wet filters were exposed to Kodak XAR-film for at least 12 h at -80 °C with an intensifying screen.

PCR amplification: The following primer sequences used for polymerase chain reaction (PCR) amplification were deduced from the previously published *orf522* nucleotide-sequence (Laver et al. 1991): primer A, 5'-CCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG-3' and primer B, 5'-CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCACG-3'. PCR amplifications were performed in a 25-µl reaction volume containing 20–40 ng of DNA, buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.001% gelatin), 200 µM of each dNTP, 0.2 µM of each primer and 2.5 units *Taq* DNA polymerase (Promega Ltd., Madison, WI, USA). The reaction was overlaid with mineral oil (Perkin Elmer, Norwalk CT, USA). Amplification was performed in a Braun (Sciencetec, France) thermocycler (Bio-med 60) programmed for 30 cycles of denaturing for 30 s at 94 °C, annealing for 30 s at 55 °C and extension for 2 min at 72 °C. An initial step at 94 °C for 3 min was applied before cycling. Amplification was ended with a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were separated on 1.4% agarose gels and stained with ethidium bromide.

Results

Origin and flower morphology of the R4 generation

Male sterile chicory plants were obtained by fusion of chicory mesophyll protoplasts and hypocotyl protoplasts derived from male sterile sunflower plants (Rambaud et al. 1993). Among the 16 CMS cybrids obtained, the male sterile plant CT41 I was chosen for the breeding programme, and the molecular analysis. It showed more vigour than the other cybrids. In a first cross, CT41 I was pollinated with poll SBZ83 and the resulting progeny was then backcrossed three times with the 'Cassel' variety, which is known to be a vigorous variety of industrial chicory. We have previously reported (Rambaud et al. 1994) that the R₁, R₂ and R₃ generations exhibited a wide range of flower morphologies: we found fertile plants, totally sterile plants (without anther and style), and two types of male-sterile plants either without anthers or with brown nondehiscent anthers. For crosses, only plants with flowers without anthers were used and in the R₄ generation, the four different types of flower morphology (Table 2) were always observed, but in different ratios. Among 7966 plants analysed, 1.9% were fertile, 6.4% were totally sterile, and 91.7% were male sterile (85.2% without anthers and 6.5% with brown anthers). Fertile and

Table 2: Different types of floral morphology in the progeny of the male sterile chicory cybrid CT41 I derived from protoplast fusion between *Cichorium intybus* L. cv. 'Magdebourg' and an *Helianthus annuus* cms line

Progenies (number of plants tested)	Fertile flowers (%)	Types of floral morphology		
		Male-sterile flowers with brown anthers (%)	Male-sterile flowers without anthers (%)	Male and female sterile flowers (%)
R ₁ (373 plants)	21.7	34	30.6	13.7
R ₂ (5689 plants)	4.3	36	44.4	15.3
R ₃ (2695 plants)	2.2	36.3	52.8	8.7
R ₄ (7966 plants)	1.9	6.5	85.2	6.4

totally sterile plants have been less frequently observed in the R₄ generation, and the ratio of male sterile plants without anthers was higher in the R₄ than in the R₃ generation.

Analysis of mitochondrial DNA

A previous study showed that mitochondrial rearrangements occurred in cybrid plants (Rambaud et al. 1993). A large part of the sunflower mitochondrial genome including the *cox*, *coxII*, *coxIII*, *atpA*, *atp6*, *rrn18s-5s* genes was incorporated in the chicory genome. A preliminary study showed that maintenance of the cybrid plant CT41/I in vitro culture for 3 years was followed by rearrangements of the mitochondrial genome (Rambaud et al. 1994). Rearrangements were also observed in the R₂ and R₃ generations, but analyses have been made only on a smaller number of plants. To confirm the instability of the mitochondrial genome and to determine whether mitochondrial genome would stabilize, RFLP analysis in the R₄ generation was performed. For this analysis, seeds were harvested from one plant of the R₃ generation (MS 20439S). The seeds were sown and 60 plants were cultured in a greenhouse.

The diversity in flower morphology among R₄ progeny from the vigorous R₃ plant was accompanied by variability in mitochondrial DNA patterns. Among the eight probes used, four (*coxI*, *nadI* 20, *nadI* 28, *nad3 rps12*) showed patterns identical to those of fertile chicory (data not shown). When *coxII* was used as a probe (Fig. 1a), patterns of the male sterile plants revealed a mixture of sunflower (4.2 kb fragment) and fertile chicory (15 kb, 12 kb, 9 kb, 5.5 kb and 1 kb fragments) mitochondrial DNA but some fragments specific to fertile chicory (9 kb, 5.5 kb, and 1 kb) had lower hybridization signals in male sterile plants.

With the *atpA* gene as a probe, no variation of the mitochondrial DNA was observed among this family regardless of which restriction enzyme was used. In addition, when total DNA was digested by *EcoRV* (Fig. 1b), *atpA* hybridized with a 8.7 kb major fragment and with a 7 kb fragment of low stoichiometry in a fertile chicory plant. In sunflower, the *atpA* gene hybridized with a 5.8 kb fragment and in male-sterile chicories, patterns were different from the two parents—*atpA* hybridized with the 8.7 kb fragment which was specific to fertile chicory and with a new fragment of 6.8 kb.

The two other probes showed variability in this R₄ progeny. When the *cox* gene was used as a probe on total DNA digested by *EcoRV* (Fig. 2), one 4.5 kb fragment hybridized with this probe in fertile chicory; in sunflower, *cox* hybridized with a 6.5

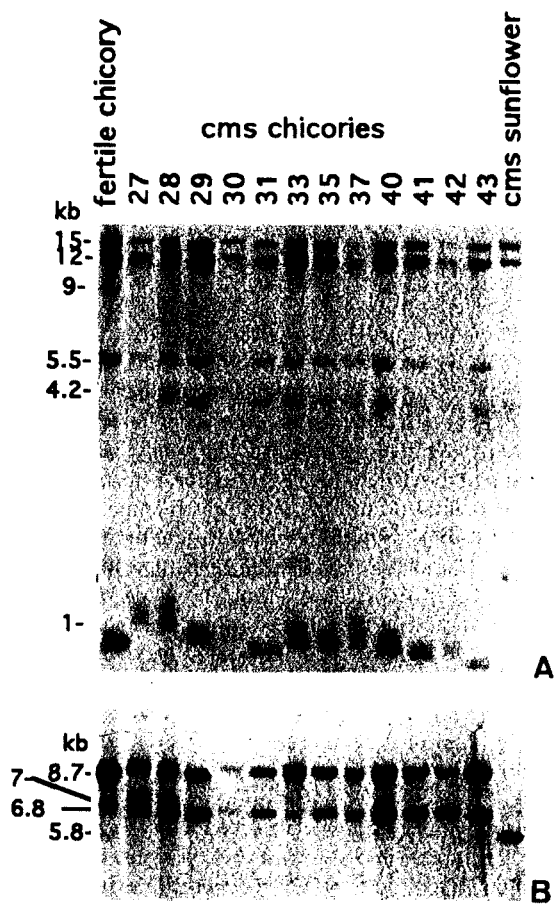


Fig. 1: Southern hybridization analysis of *EcoRV* digested total DNA of the progeny from MS 20439S. *Cichorium intybus* L. cv. 'Magdebourg' (fertile chicory), *Helianthus annuus* (cms) (cms sunflower) and 12 different siblings of sexual progeny (lanes 27, 28, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 40, 41, 42, 43); A. using *coxII* as a probe; B. using *atpA* as a probe; fragment sizes are given in kb

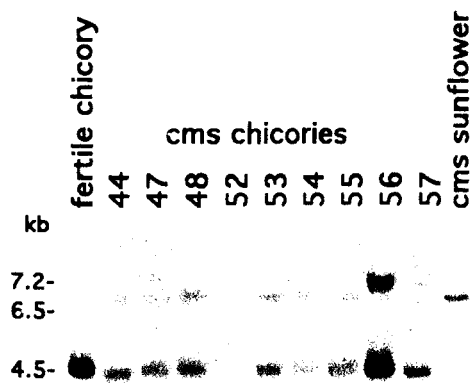


Fig. 2: Southern hybridization analysis of *EcoRV* digested total DNA of the progeny from MS 20439S using *cob* as a probe. *Cichorium intybus* L. cv. 'Magdebourg' (fertile chicory), *Helianthus annuus* (cms) (cms sunflower) and 9 different siblings of sexual progeny (lanes 44, 47, 48, 52, 53, 54, 55, 56, 57); fragment sizes are given in kb

kb fragment and in male sterile plants, three mitotypes could be seen (Fig. 2). In most cases, *cob* hybridized with the two fragments of 4.5 kb and 6.5 kb from chicory and sunflower (lanes 48, 53, 54 and 55 in Fig. 2) but in some cases (10 plants

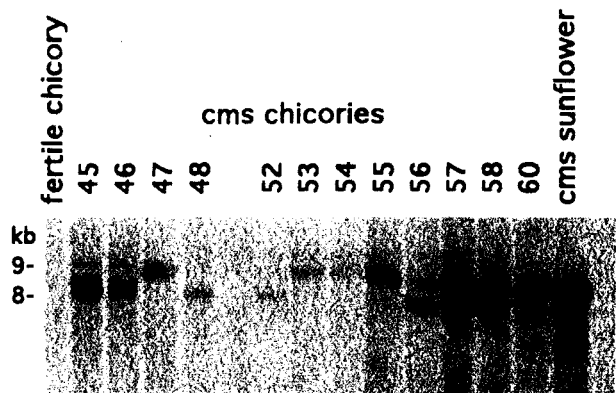


Fig. 3: Southern hybridization analysis of *HindIII* digested total DNA of the progeny from MS 20439S using *orf522* as a probe. *Cichorium intybus* L. cv. 'Magdebourg' (fertile chicory), *Helianthus annuus* (cms) (cms sunflower) and 12 different siblings of sexual progeny (lanes 45, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60); fragment sizes are given in kb

out of 50), the probe hybridized with an additional fragment of 7.2 kb (lanes 44, 47 and 57 in Fig. 2). In some other cases (eight out of 50 plants tested) *cob* hybridized with the 4.5 kb fragment specific to fertile chicory and with the additional fragment of 7.2 kb (lanes 52 and 56 in Fig. 2). The mitochondrial sequence *orf522*, associated with cytoplasmic male sterility in sunflower, has been used as a probe. In sunflower, *orf522* hybridized with a 9 kb *HindIII* fragment and a fainter 7 kb fragment. Results showed that *orf522* was absent from fertile chicory but was present in the mitochondrial genome of male-sterile chicory. High polymorphism in the restriction fragments could be observed among 12 plants analysed (Fig. 3), four different patterns could be detected. *Orf522* hybridized with a 9 kb fragment in some plants (lanes 47, 53, 54, 55 and 60 in Fig. 3), in other plants *orf522* hybridized with an 8 kb *HindIII* fragment (lanes 48 and 52 in Fig. 3) and in other plants with the two 8 and 9 kb fragments (lanes 56, 57 and 58 in Fig. 3). For two lanes (45 and 46 in Fig. 3), the pattern was different still, *orf522* hybridized with three fragments of 9, 8.2 and 8 kb.

RFLP analysis of the *atpA-orf522* region

RFLP analysis showed that the *atpA* gene was located near a rearrangement site and that *orf522* was present in the CMS chicories tested. In male sterile sunflower, *atpA* is cotranscribed with *orf522* and is located near a 265 bp repeat (Laver et al. 1991, Horn et al. 1991). The presence of these two cotranscribed genes was investigated in different families of the R₄ generation. Analyses were made on 80 plants; eight plants were selected at random in 10 families (20493T, 20494T, 20521T, 20531T, 20762T, 20763T, 20564T, 20565T, 20596T, 20597T) derived from different crosses from CT41 1. *AtpA* was used as a probe on total DNA digested by *EcoRI*, *EcoRV* and *HindIII*. Results showed that the 6.8 kb *EcoRV* fragment observed in the 20439S family previously studied, was present in only five families (20531T, 20564T, 20565T, 20762T, 20763T) and this fragment was unstable within these families, as shown, for example, in Fig. 4, for the 20565T family in which only half of the plants had the 6.8 kb *EcoRV* fragment. In the other five families, cytoplasmic male-sterile chicories exhibited the same pattern as fertile chicory. These results led us to search for the presence of *orf522* in the 10 families. When *orf522* was used as a probe, the analysis revealed that this orf was present in the 80 chicories derived from the 10 families tested. A polymorphism could be

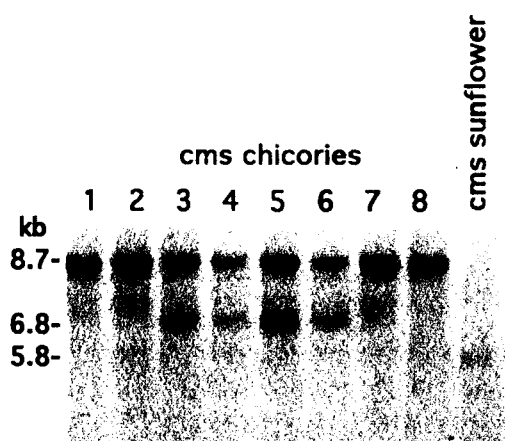


Fig. 4: Southern hybridization analysis of *EcoRV* digested total DNA of the progeny from MS 20565T using *atpA* as a probe. *Helianthus annuus* (cms) (cms sunflower) and 8 different siblings of sexual progeny (lanes 1–8); fragment sizes are given in kb

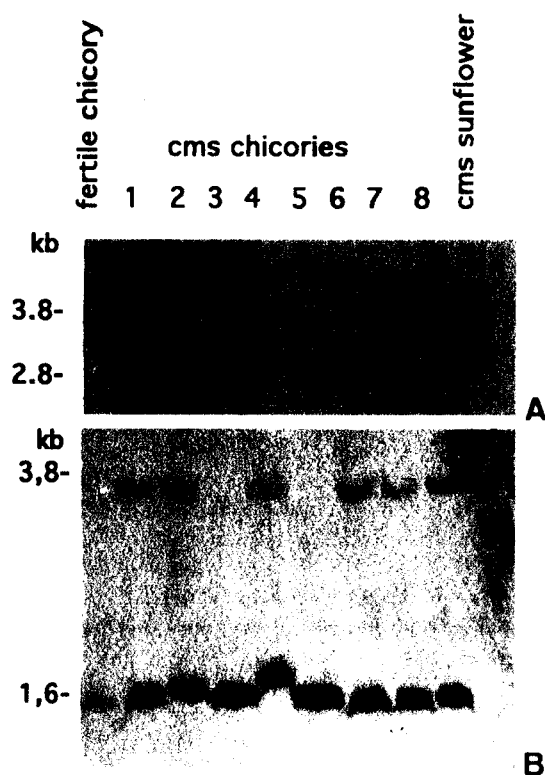


Fig. 5: Southern hybridization analysis of *EcoRI* digested total DNA of the progeny from 20564T: A, using *orf522* as a probe; B, using *atpA* as a probe. *Cichorium intybus* L. cv. 'Magdebourg' (fertile chicory), *Helianthus annuus* (cms) (cms sunflower) and 8 different siblings of sexual progeny (lanes 1–8). Fragment sizes are given in kb

observed that might be related to the presence or absence of the sunflower *atpA* gene in the CMS chicories (Fig. 5b). In fertile chicory, when the *atpA* gene was used as a probe, it hybridized with a 1.6 kb *EcoRI* fragment. In sunflower, the *atpA* gene hybridized with a 3.8 kb *EcoRI* fragment: it is the same fragment that hybridized with the *orf522* gene. In some male-sterile chicories (lanes 1, 2, 4, 6, 7 and 8, Fig. 5b), *atpA* hybridized with a 1.6 kb *EcoRI* fragment, as in fertile chicories, and with the 3.8 kb fragment, as in sunflower; in these male-sterile chicories, the two genes *atpA* and *orf522* were linked, as in sunflower. When

the two genes were not linked in the male sterile chicories, the probe *atpA* hybridized only with a 1.6 kb fragment (lanes 3 and 5 in Fig. 5b) and the gene *orf522* with a 2.8 kb fragment (lanes 3 and 5 in Fig. 5a). The presence of the *orf522* in the CMS chicories was also analysed by PCR. In all the plants tested, an internal fragment of 344 bp hybridized with the *orf522* sequence and could be amplified (data not shown).

Is there a relation between the restriction fragments polymorphism and the different types of floral morphology?

All the plants used in RFLP analysis were grown to flowering and different types of floral morphology could be observed, as described previously. A relation between the polymorphism in the restriction fragments and the different types of floral morphology was investigated. For the family MS 20439S, 29 plants were analysed and three types of floral morphology could be observed: without anthers, with brown anthers and totally sterile. Restriction patterns showed variability with only two probes, *orf522* and *cob*; with the *cob* gene, three mitotypes were determined but no correlation could be made with the three types of floral morphology. For example, the male-sterile chicories nos. 17, 19 and 21 had the same type of male sterility, without anthers, but these three plants had three different mitotypes. Conversely, three plants with the same mitotype could have three types of floral morphology, as was the case for the male-sterile chicories nos. 3, 5 and 17.

The study was extended to 10 families, in which the restriction fragment polymorphism was observed with the *cob* gene and the *orf522* sequence and also with the *atpA* gene which may or may not be linked to the *orf522* sequence. In these families no correlation could be detected between the mitotypes and floral morphology. In these same 10 families, some fertile chicories were observed, but *orf522* was always present.

Discussion

MtDNA alteration in the fourth progeny

Cytoplasmic male sterility was introduced into chicory by protoplast fusion between chicory and sunflower (Rambaud et al. 1993). The examination of morphological features, the chromosome number, the chloroplastic and mitochondrial genomes indicated that only the mitochondrial genome of the cybrid plants was rearranged. In this study, we have shown that a large part of the sunflower mitochondrial genome which includes the *coxII*, *coxIII*, *cob*, *atpA*, *atp6*, *rrn5s-18s* and *orf522* genes, was incorporated into the mitochondrial genome of the cytoplasmic male-sterile chicories. Owing to a heteroprotoplasmic fusion the mitochondrial genome is not stably inherited in the sexual progeny of the cybrid. After four generations, sunflower mitochondrial genes are still present and a part of the mitochondrial genome has been stabilized but a region including the *cob*, *atpA* and *orf522* genes appears particularly variable. That part of the mitochondrial DNA of sunflower containing the *atpA*, *cob* and *orf522* genes is the single region of the sunflower mitochondrial genome that has been rearranged in male-sterile sunflower (Siculella and Palmer 1988). The comparison of the cybrid CT41/1 RFLP profiles after protoplast fusion (Rambaud et al. 1993) showed that the *atpA* gene hybridized with two fragments in the male-sterile chicories: the fragment from chicory and the fragment from sunflower. After four generations we can see, in some plants, that the fragment derived from sunflower might be eliminated, with only *atpA* from chicory being present. It appears that the mitochondrial genome of chicory approaches

an equilibrium which involves the initial elimination of some part of the mitochondrial DNA. Is there a molecular mechanism capable of eliminating mitochondrial gene copies that are useless to plants? With the gene *cob*, implied rearrangements do not lead to the elimination of the gene but it looks as if there are fluctuations between many structures of the genome. As stated by Atlan and Couvet (1993), a highly recombining genome may reach an equilibrium stable enough to give constant frequencies of the molecules among generations. In male-sterile chicories, this stable equilibrium is still not reached.

The nucleus involvement in determining mitochondrial genome structure needs to be considered when evaluating our results. It was demonstrated that the nuclear genotype is a determining factor for reversion to fertility. In *Phaseolus vulgaris*, the presence of the *Fr* gene in the nuclear genome brings about the loss of at least 25 kb of the mitochondrial genome (Mackenzie and Chase 1990). Nuclear genotype may also induce changes in the stoichiometry of the different mitochondrial molecules (Small et al. 1988). Industrial chicory has been weakly selected and varieties used to pollinate the male-sterile plants constituted populations: it is possible that rearrangements detected in the mitochondrial genome of the various siblings of the fourth progeny are related to their individual chromosomal backgrounds.

There are only a few reports about the stability of the mitochondrial genome of cybrid sexual progenies. Alterations were reported in sexual progeny of somatic hybrids of tobacco (Aviv and Galun 1987) or petunia (Izhar et al. 1983). Sakai and Imamura (1992) have also reported alterations in the mitochondrial DNA region containing the *atpA* gene in the progeny siblings of cybrids between *Raphanus sativus* and *Brassica napus*. In this case, alterations resulted from large differences in the stoichiometry of the existing mitochondrial genome constitution rather than *de novo* recombination. In male-sterile chicory, it appears that alterations occurred at two levels: at the stoichiometric level for the *coxII* or *cob* genes, or as the result of rearrangements, as is the case with the *atpA* and *orf522* genes that were linked in some plants but not in others.

In parallel to mitochondrial genome variability, the fourth progeny of the male-sterile cybrid gave plants with multiple floral morphologies, although the majority of these plants were male sterile without anthers. The low percentages of fertile and totally sterile plants showed that the character was not stabilized, but the comparison of the results from the first progeny showed a significant decrease in the number of fertile plants. This floral morphological instability could be produced by mitochondrial rearrangements in the male-sterile chicories, but in this study correlation could be made between the floral morphology and the different mitotypes. Perhaps an alloplasmic situation in a large nuclear background could explain how a wide range of floral morphologies was observed.

Could *orf522* be responsible for CMS in chicory?

Is CMS governed by the *orf522* gene, or by a new chimeric gene created by rearrangement of the mitochondrial genomes, or a consequence of an alloplasmic situation? We cannot fully answer these questions but, in cytoplasm CT 41 I, we have found that *orf522* was always present. Strangely, it is also present even if the plants become fertile. Why did the mitochondrial genome eliminate the *atpA* sequence from the male-sterile chicory genome and not *orf522*? Perhaps it is due to the single copy of this gene in the mitochondrial genome of the chicory, whereas

atpA is a common gene in the mitochondrial genome of all the plants. This observation would favour the implication of *orf522* in the male sterility of the chicory. No other part of the mitochondrial genome appears to be rearranged as much as the *orf522* region, and so a major part of the mitochondrial genome should probably be investigated. If *orf522* is responsible for CMS in chicory, how was *orf522* transcribed when it is not linked to *atpA*, because in sunflower, the two genes are cotranscribed (Laver et al. 1991, Horn et al. 1991)? This question is now under investigation.

We cannot exclude the hypothesis of the alloplasmic situation; the wide range of floral morphology was in accordance with this hypothesis because of the non-selected industrial chicory.

We also observed a modification of stoichiometry of the DNA fragments that hybridized with the *coxII* gene, notably a 9 kb *EcoRV* fragment that is in a very slight stoichiometry. The alteration of part of the mitochondrial genome could be responsible for the nontranscription or nontranslation of the *coxII* gene, as was shown by Chétrit et al. (1992) in two male-sterile protoclones in which the reorganized region of the *nad5* gene leads to the loss of a 40 kDa polypeptide and to the appearance of a new 20 kDa one.

Because of the number of mitochondrial genes which are implicated in the genome alteration of the sexual progeny siblings, we are now considering a study of the mitochondrial polypeptides by *in organello* synthesis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr F. Monéger and to Dr P. Saumitou-Laprade for the *Helianthus orf522* and the *Oenothera* gene probes. This work was supported by the Etablissements Florimond-Desprez and the Fondation de la Chicorée de France.

References

- Akagi, H., T. Taguchi, and T. Fujimura, 1995: Stable inheritance and expression of the cms traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 563–567.
- Anderson, M. L. M., and B. D. Young, 1985: Quantitative filter hybridization. In: B. D. Hames, S. J. Higgins (eds), *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, 73–111. IRL Press, New York.
- Atlan, A., and D. Couvet, 1993: A model simulating the dynamics of plant mitochondrial genomes. *Genetics* **135**, 213–222.
- Aviv, D., and E. Galun, 1987: Chondriome analysis in sexual progeny of *Nicotiana* cybrids. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 821–826.
- Braun, C. J., G. G. Brown, and C. S. Levings III, 1992: Cytoplasmic male sterility. In: R. G. Herman (ed.), *Plant Gene Research: Cell Organelles*, 219–245. Springer Verlag, Vienna.
- Chétrit, P., R. Rios, R. de Paepe, V. Vitart, S. Gutierrez, and F. Vedel, 1992: Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana sylvestris* protoclones. *Curr. Genet.* **21**, 131–137.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks, 1983: A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **1**, 19–21.
- Hanson, M. R., 1991: Plant mitochondrial mutations and male-sterile genes. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 461–486.
- , and M. F. Conde, 1985: Function and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants. *Int. Rev. Cytol.* **94**, 213–267.
- Hiesel, R., and A. Brennicke, 1983: Cytochrome oxidase subunit II gene in mitochondria of *Oenothera* has no intron. *EMBO J.* **6**, 29–34.
- Horn, R., R. H. Köhler, and K. Zetsche, 1991: A mitochondrial 16

- kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol. Biol.* **17**, 29—36.
- Izhar, S., M. Schlichter, and D. Swartzberg, 1983: Sorting out of cytoplasmic elements in somatic hybrids of *Petunia* and the prevalence of the heteroplasmon through several meiotic cycles. *Mol. Gen. Genet.* **190**, 468—474.
- Köhler, R. H., R. Horn, A. Lössl, and K. Zetsche, 1991: Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 369—376.
- Laver, H. K., S. J. Reynolds, F. Monéger, and C. J. Leaver, 1991: Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J.* **1**, 185—193.
- Mackenzie, S. A., and C. D. Chase, 1990: Fertility restoration is associated with loss of a portion of the mitochondrial genome in cytoplasmic male-sterile common bean. *Plant Cell* **2**, 905—912.
- Nair, C. K. K., 1993: Mitochondrial genome organization and cytoplasmic male sterility in plants. *J. Biosci.* **18**, 407—422.
- Newton, K. J., 1988: Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 503—532.
- Nivison, H. T., and M. R. Hanson, 1989: Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male-sterility in *Petunia*. *Plant Cell* **1**, 1121—1130.
- Rambaud, C., J. Dubois, and J. Vasseur, 1993: Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* **87**, 347—352.
- Rambaud, C., A. Bellamy, and J. Vasseur, 1994: La stérilité male cytoplasmique chez la chicorée industrielle: obtention par fusion de protoplastes et caractérisation moléculaire. In: AUPELF-UREF (ed.), *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* 455—461. John Libbey Eurotext, Paris.
- Sakai, T., and J. Imamura, 1992: Alteration of mitochondrial genomes containing *atpA* genes in the sexual progeny of cybrids between *Raphanus sativus* cms line and *Brassica napus* cv. Westar. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 923—929.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Schuster, W., and A. Brennicke, 1985: TAG-Termination codon in the apocytochrome b gene from *Oenothera* mitochondrial. *Curr. Genet.* **9**, 157—163.
- Schuster, W., and A. Brennicke, 1986: Pseudocopies of the *atpA* α subunit gene in *Oenothera* mitochondrial are present on different circular molecules. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 29—35.
- Siculella, L., and J. D. Palmer, 1988: Physical and gene organisation of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower cms-associated variation in structure and transcription of the *atpA* gene. *Nucl. Acids Res.* **16**, 3787—3799.
- Small, L. R., Suffolk, and C. J. Leaver, 1989: Evolution of plant mitochondrial DNA via substoichiometric intermediates. *Cell* **58**, 69—76.

Bibliographie

7. Bibliographie

- Abad A.R., Mehrstens B.J., Mackenzie S.A. (1995). Specific expression in reproductive tissue and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell*. 7, 271-285
- André J. (1994). Mitochondria. *Biol. Cell*. 80, 103-106
- Bannerot H., Boulidard L., Cauderon Y., Tempé J. (1974). Cytoplasmic male sterility transfer from *Raphanus* to *Brassica*. *Proc. EUCARPIA Crop Sect., Cruciferae*. 25, 52-54
- Bannerot H., Boulidard L., Chupeau Y. (1977). Unexpected difficulties met with the radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. *Eucarpia Cruciferae Newslett.* 2, 16
- Bannerot H., Charbonnier L. (1987). Induction de stérilités mâles cytoplasmiques dans le genre *Phaseolus*: étude génétique et moléculaire. Bervillé A. (ed) Variabilité génétique cytoplasmique de la stérilité mâle cytoplasmique. INRA édition, Paris. 181-198
- Bellamy A., Vedel F., Bannerot H. (1996). Varietal identification in *Cichorium intybus* L. and determination of genetic purity of F1 hybrid seed samples based on RAPD markers. *Plant Breeding*. 115, 128-132
- Bellaoui M., Pelletier G., Budar F. (1997). The steady-state level of mRNA from the Ogura cytoplasmic male sterility locus in *Brassica* cybrids is determined post-transcriptionally by its 3' region. *EMBO J.* 16, 5057-5068
- Belliard G., Vedel F., Pelletier G. (1978). Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* 165, 231-237
- Belliard G., Vedel F., Pelletier G. (1979). Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature*. 281, 401-403
- Bergman P., Hernould M., Glimelius K. (1994). RNA editing of the tobacco mitochondrial *orf 38/220*. *Plant Physiol.* 106, 1223-1224
- Berthe B. (1997). Influence du génome nucléaire sur la stabilisation des cytoplasmes mâle-stériles 411 et 524 de la chicorée: aspects moléculaires et cytologiques. Mémoire de DEA, Université de Lille-I
- Binder S., Marchfelder A., Brennicke A. (1996). Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant. Mol. Biol.* 32, 303-314
- Bond D.A., Fyfe J.L., Toynbee-Clarke G. (1966). Male sterility in field beans'3: male setrility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. Agric. Sci.* 66, 359-367
- Bonen L. (1991). The mitochondrial genome: so simple yet so complex. *Curr. Opinion Genet Devel.* 1, 515, 522
- Bonen L., Brown G.G. (1993). Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organisation and expression in plant mitochondria. *Can. J. Bot.* 71, 645-660

- Bonhomme S., Budar F., Férault M., Pelletier G. (1991). A 2.5 kb *Nco I* fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* cybrids. *Curr. Genet.* 19, 121-127
- Bonhomme S., Budar F., Lancelin D., Small I., Defrance M-C., Pelletier G. (1992). Sequence and transcript analysis of the *Nco* 2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 235, 340-348
- Bonnet A. (1975). Introduction et utilisation d'une stérilité mâle cytoplasmique dans des variétés précoces européennes de radis *Raphanus sativus* L.. *Ann. Amélior. Plantes.* 25, 381-397
- Bonnet A. (1977). Breeding in France of a radish F1 hybrid obtained by use of cytoplasmic male sterility. *Eucarpia Cruciferae* Newslett. 2, 5
- Bonnett H.T., Glimelius K. (1983). Somatic hybridisation in *Nicotiana*: behaviour of organelles after fusion of protoplasts from male-fertile and male-sterile cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 65, 213-217
- Bonnett H.T., Kofer W., Hakansson G., Glimelius K. (1991). Mitochondrial involvement in petal and stamen development studied by sexual and somatic hybridisation of *Nicotiana* species. *Plant Sci.* 80, 119-130
- Breiman A., Galun E. (1990). Nuclear-mitochondrial interrelation in Angiosperms. *Plant Sci.* 71, 3-19
- Brennicke A., Grohmann L., Hiesel R., Knoop V., Schuster W. (1993). The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Lett.* 325, 140-145
- Chase C.D. (1994). Expression of CMS-unique and flanking mitochondrial DNA sequences in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.* 25, 245-251
- Chase C.D., Ortega V.M. (1992). Organisation of ATPA coding and 3' flanking sequences associated with cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.* 22, 147-153
- Clarck E., Schnabelrauch L., Hanson M.R., Sink K.C. (1986). Differential fate of plastid and mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 72, 748-755
- Connett M. B., Hanson M.R. (1994). Molecular studies of cytoplasmic male sterility in *Petunia*. E.G. Williams et al. (eds). *Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants.* 513-530
- Cui X., Wise R.P., Schnable P.S. (1996). The *Rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science.* 272, 1334-1336
- Dean C., van den Elzen P., Tamaki S., Dunsmuir P., Bedbrook J. (1985). Differential expression of the eight genes of the *Petunia* ribulose biphosphate carboxylase small subunit multi-gene family. *EMBO J.* 4, 3055-3061
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1, 19-21
- Delourme R., Bouchereau A., Renard M. (4-7 July 1995). Breeding double low restorer lines in radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) Rapeseed today and tomorrow. "9th International Rapeseed Congress Cambridge". 1, 6-8

- Dewey R.E., Timothy D.H., Levings C.S. III (1987). A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84, 5374-5378
- Dixon L.K., Leaver C. (1982). Mitochondrial gene expression and cytoplasmic male sterility in *Sorghum*. *Plant Mol. Biol.* 1, 89-102
- Evans D.A., Bravo J.E., Kut S.A., Flick C.E. (1983). Genetic behaviour of somatic hybrids in the genus *Nicotiana*: *N. otophora* + *N. sylvestris* + *N. tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 65, 93-101
- Fauron C. M.R., Moore B., Casper M. (1995). Maize as a model of plant mitochondrial genome plasticity. *Plant Sci.* 112, 11-32
- Flavell R.B. (1974). A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize. *Plant Sci. Letter.* 3, 259-263
- Forde B.G., Olivier R.J.C., Leaver C.J. (1978). Variation in mitochondrial translation products associated with male sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75, 3841-3845
- Galun E., Arzee-Gonen P., Fluhr R., Edelman M., Aviv D. (1982). Cytoplasmic hybridisation in *Nicotiana*: mitochondrial DNA analysis of progenies resulting from fusion between protoplasts having different organelle constitutions. *Mol. Gen. Genet.* 186, 50-56
- Glab N., Petit P.X., Slonimski P.P. (1993). Mitochondrial dysfunction in yeast expressing the cytoplasmic male sterility T-*urf13* gene from Maize-Analysis at the population and individual cell level. *Mol. Gen. Genet.* 236, 299-308
- Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. (1993). Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell.* 5, 1217-1229
- Graves P.V., Begu D., Velours J., Neau E., Belloc F., Litvak S., Araya A. (1990). Direct protein sequencing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9 confirms RNA editing in plants. *J. Mol. Biol.* 214, 1-6
- Gray M.W., Lang B.F., Cedergren R., Golding G.B., Lemieux C., Sankoff D., Turnel M., Brossard N., Delage N., Littlejohn T.G., Plante I., Rioux P., Saint-Louis D., Zhu Y., Burger G. (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucl. Acids Res.* 26, 865-878
- Grelon M., Budar F., Bonhomme S., Pelletier G. (1994). Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 243, 540-547
- Gualberto J.M., Bonnard G., Lamattina L., Grienemberger J.M. (1991). Expression of the wheat mitochondrial *nad3-rps12* transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation. *Plant Cell.* 3, 1109-1120
- Hanson M.R. (1991). Plant mitochondrial mutations and male sterility *Ann. Rev. Genet.* 25, 461-86
- Hanson M.R., Condé M.F. (1985). Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants. *Int. Rev. Cytol.* 94, 213-267
- Hanson M.R., Pruitt K.D., Nivison H.T. (1989). Male sterility loci in plant mitochondrial genomes. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology.* 6, 61-85

- Hanson R.M., Sutton C.A., Lu B. (1996). Plant organelle gene expression: altered by RNA editing. *Theor. Appl. Genet.* 1, 57-64
- Harris E. (1989). The *Chlamydomonas* source book. Academic Press, New York
- Hartmann C., Henry Y., De Buyser J., Aubry C., Rode A. (1989). Identification of new mitochondrial genome organisations in wheat plants regenerated from somatic tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 77, 169-175
- He S., Abad A., Gelvin S.B., Mackenzie S.A. (1996). A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 11763-11768
- He S., Yu Z.H., Vallejos C.E., Mackenzie S.A. (1995). Pollen fertility restoration by nuclear gene *Fr* in CMS common bean: an *Fr* linkage map and the mode of *Fr* action. *Theor. Appl. Genet.* 90, 1056-1062
- Heller R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14, 1-223
- Hernould M., Suharsono S., Litvak S., Araya A., Mouras A. (1993). Male sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2370-2374
- Hervieu F., Bannerot H., Pelletier G. (1994). A unique cytoplasmic male sterility (CMS) determinant is present in three *Phaseolus* species characterised by different mitochondrial genomes. *Theor. Appl. Genet.* 88, 314-320
- Hervieu F., Charbonnier L., Bannerot H., Pelletier G. (1993). The cytoplasmic male-sterility (CMS) determinant of common bean is widespread in *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.* 24, 149-155
- Heyn F.W. (1976). Transfer of restorer genes from *raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Eucarpia Cruciferae* Newslett. 1, 15-16
- Heyn F.W. (1978). Cytoplasmic-genetic male sterility in *Brassica napus*. *Eucarpia Cruciferae* Newslett. 3, 34-35
- Horner H.T., Palmer R.G. (1995). Mechanisms of genetic male sterility. *Crop Sci.* 35, 1527-1535
- Hunt M., Newton K.J. (1991). The NCS3 mutation: genetic evidence for the expression of ribosomal protein genes in *Zea mays* mitochondria. *EMBO J.* 10 1045-1052
- Izhar S., Schlicter M., Swartzberg D. (1983). Sorting out of cytoplasmic elements in somatic hybrids of *Petunia* and the prevalence of the heteroplasmon through several meiotic cycles. *Mol. Gen. Genet.* 190, 468-474
- Janska H., Mackenzie S.A. (1993). Unusual mitochondrial genome organisation in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility. *Genetics.* 135, 869-879
- Joyce P.B.M., Gray M.W. (1989). Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria. *Nucl. Acids Res.* 17, 5461-5476

- Kaleikau E.K., André C.P., Walbot V. (1992). Structure and expression of the rice mitochondrial apocytochrome b gene (*cob-1*) and pseudogene (*cob-2*). *Curr. Genet.* 22, 463-470
- Kamps T.L., McCarty D.R., Chase C.D. (1996). Gametophyte genetics in *Zea mays* L.: dominance of a restoration of fertility allele (*Rf3*) in diploid pollen. *Genetics*. 142, 1001-1007
- Kaul M.L.H. (1988). Male sterility in higher plants. In : Frankel R., Grossman M., Linskens H.F., Maliga P., Riley R. (eds) Monographs on theoretical and applied genetics. Springer Verlag, Heidelberg Vol. 10
- Kemble R.J., Barsby T.L., Wong R.S. C., Shepard J.F. (1986). Mitochondrial DNA rearrangements in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 72, 787-793
- Kennel J.C., Wise R.P., Pring D.R. (1987). Influence of a nuclear background on transcription of a maize mitochondrial region associated with Texas male sterile cytoplasm. *Mol. Gen. Genet.* 210, 399-406
- Kennell J.C., Pring D.R. (1989). Initiation and processing of *atp6*, *T-urf13* and ORF221 transcripts from mitochondria of T-cytoplasm of maize. *Mol. Gen. Genet.* 216, 16-24
- Knoop V., Schuster W., Brennicke A. (1991). *Trans* splicing integrates an exon of 22 nucleotides into the *nad5* mRNA in higher plant mitochondria. *EMBO J.* 10, 3483-3493
- Kofer W., Glimelius K., Bonnett H.T. (1992). Fusion of male-sterile tobacco causes modifications of mtDNA leading to changes in floral morphology and restoration of fertility in hybrid plants. *Physiol. Plant.* 85, 334-338
- Köhler R.H., Horn R., Lössl A., Zetsche K. (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 227, 369-376
- Korth K.L., Levings C.S. III (1993). Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF 13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 3388-3392
- Korth K.L., Kaspi C.I., Siedow J.N., Levings C.S. III (1991). URF13, a maize mitochondrial pore-forming protein, is oligomeric and has a mixed orientation in *Escherichia coli* plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10865-10869
- Kothari S.L., Monte D.C., Widholm J.M. (1986). Selection of *Daucus carota* somatic hybrids using drug resistance and characterisation of their mitochondrial genomes. *Theor. Appl. Genet.* 72, 494-502
- Krishnasamy S., Makaroff C.A. (1993). Characterisation of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relation with male sterility in *Ogura* radish. *Curr. Genet.* 24, 156-163
- Kurland C.G. (1992). Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code. *BioEssays.* 14, 709-714
- Kyozuka J., Kaneda T., Shimamoto K. (1989). Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. *Bio/Technology.* 7, 1171-1174

- Landgren M., Glimelius K. (1990). Analysis of chloroplast and mitochondrial segregation in three different combinations of somatic hybrids produced within *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 80, 776-784
- Landgren M., Glimelius K. (1994 a). A high frequency of intergenomic mitochondrial recombination and an overall biased segregation of *B. campestris* or recombined *B. campestris* mitochondria were found in somatic hybrids made within *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 87, 854-862
- Landgren M., Sundberg E., Glimelius K. (1994 b). Biased mitochondrial segregation, independent of cell type used for fusion and of hybrid nuclear DNA content, was found in *Brassica napus* (+) *B. oleracea* somatic hybrids. *Plant Sci.* 103, 51-57
- Laver H.K., Reynolds S.J., Monéger F., Leaver C.J. (1991). Mitochondrial genome organisation and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J.* 1, 185-193
- Leblanc C., Richard O., Kloareg B., Viehmann S., Zetsche K., Boyen C. (1997). Origin and evolution of mitochondria: what have we learnt from red algae. *Curr. Genet.* 31, 193-207
- Leclercq P. (1969). Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plantes.* 19, 99-106
- Leclercq P. (1971). La stérilité mâle cytoplasmique du tournesol. *Ann. Amélior. Plantes.* 21, 45-54
- Lefebvre A., Scalla R., Pfeiffer P. (1990). The double-stranded RNA associated with 447 cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Mol. Biol.* 14, 477-490
- Levings C.S. III (1993). Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell.* 5, 1285-1290
- Levings C.S. III, Dewey R.E. (1988). Molecular studies of cytoplasmic male sterility in maize. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 319, 93-102
- Levings C.S. III, Siedow J.N. (1992). Molecular bases of disease susceptibility in Texas cytoplasm of maize. *Plant Mol. Biol.* 19, 135-147
- Liu A. W., Narayanan K.K., André C.P., Kaleikau E.K., Walbot V. (1992). Cotranscription of *orf25* and *coxIII* in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 21, 507-513
- Lonsdale D.M., Hodge T.P., Howe C.J., Stern D.B. (1983). Maize mitochondrial DNA contains a sequence homologous to the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase large subunit gene of chloroplast DNA. *Cell.* 34, 1007-1014
- Macfarlane J.L., Wahleithner J.A., Wolstenholme D.R. (1990). A broad bean mitochondrial *atp6* gene with an unusually simple, non-conserved 5' region. *Curr. Genet.* 18, 87-91
- Mackenzie S., He S., Lyznik A. (1994). The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.* 105, 755-780
- Maloney A.P., Walbot V. (1990). Structural analysis of mature and dicistronic transcripts from 18 S and 5 S ribosomal RNA genes of maize mitochondria. *J. Mol. Biol.* 213, 633-649

- Maréchal-Drouard L., Guillemaut P., Cosset A., Arbogast M., Weber F., Weil J.H., Dietrich A. (1990). Transfer RNAs of potato (*Solanum tuberosum*) mitochondria have different genetic origins. Nucl. Acids Res. 18, 3689-3696
- Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R.B. (1990). Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature. 347, 736-741
- Mariani C., Gossele V., de Beuckeleer M., de Block M., Goldberg R.B., de Greef W., Leemans J. (1992). A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature. 357, 384-387
- Martin W., Müller M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature. 395, 37-41
- Martin N. (1996). Etude morphologique et cytologique de la stérilité mâle cytoplasmique de l'endive (*Cichorium intybus* L.) : travaux préliminaires. Mémoire de Maîtrise, Université Pierre et Marie Curie Paris 6.
- Mascarenhas J.P. (1990). Gene activity during pollen development. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 41, 317-338
- McCarty D.M., Hehman G.L., Hauswirth W.W. (1988). Nucleotide sequence of the *Zea mays* mitochondrial cytochrome oxidase subunit III gene. Nucl. Acids Res. 16, 20, 9873
- Melchers G., Mohri Y., Watanabe K., Wakabayashi S., Harada K. (1992). One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 6832-6836
- Monéger F., Smart C.J., Leaver C.J. (1994). Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. EMBO J. 13, 8-17
- Morel E., Wetmore R.H. (1951). Fern callus tissue culture. Am. J. Bot. 38, 141-143
- Morèle-Le Paven M.C., De Buyser J., Henry Y., Corre F., Hartmann C., Rode A. (1992). Multiple patterns of mtDNA reorganisation in plants regenerated from different *in vitro* cultured explants of a single wheat variety. Theor. Appl. Genet. 85, 9-14
- Muise R.C., Hauswirth W.W. (1992). Transcription in maize mitochondria: effects of tissue and mitochondrial genotype. Curr. Genet. 22, 235-242
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497
- Newton K.J. (1988). Plant mitochondrial genomes: organisation, expression and variation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 503-32
- Nivison H.T., Hanson M.R. (1989). Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in *Petunia*. Plant Cell. 1, 1121-1130
- Ogura H. (1968). Studies of the new male sterility in Japanese radish, with special references to utilisation of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 6, 39-78

- Palmer J.D., Herbon L.A. (1987). Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 11, 565-570
- Palmer J.D. (1988). Intraspecific variation and multicircularity in *Brassica* mitochondrial DNAs. *Genetics.* 118, 341-351
- Palmer J.D. (1992). Mitochondrial DNA in plant systematics: application and limitations. In Soltis P., Soltis D. and Doyle J. (ed). *Molecular systematics of plants.* 36-49
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chétrit P., Rémy R., Rousselle P., Renard M. (1983). Intergeneric cytoplasmic hybridisation in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191, 244-250
- Pelletier G., Chupeau Y. (1984). Plant protoplast fusion and somatic plant cell genetics. *Physiol. Vég.* 22, 377-399
- Phillips R.L., Kaeppler S.M., Olhoft P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5222-5226
- Pring D.R., Lonsdale D.M. (1985). Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA. *Int. Rev. Cytol.* 97, 1-46
- Pruitt K.D., Hanson M.R. (1991). Transcription of the petunia mitochondrial CMS-associated *Pcf* locus in male sterile and fertility-restored lines. *Mol. Gen. Genet.* 227, 348-355
- Pruitt K.D., Hanson M.R. (1989). Cytochrome oxidase subunit II sequences in *Petunia* mitochondria: two intron-containing genes and an intron-less pseudogene associated with cytoplasmic male sterility. *Curr. Genet.* 16, 281-291
- Rambaud C., Bellamy A., Dubreucq A., Bourquin J.-C., Vasseur J. (1997). Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from cytoplasmic male sterile chicory cybrid. *Plant Breeding.* 116, 481-486
- Rambaud C., Dubois J., Vasseur J. (1993). Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion *Theor. Appl. Genet.* 87, 347-352
- Rapp W.D., Shelley Lupold D., Mack S., Stern D.B. (1993). Architecture of the maize mitochondrial *atp1* promoters as determined by linker-scanning and point mutagenesis. *Mol. Cell Biol.* 13, 7232-7238
- Reboud X., Zeyl CL (1994). Organelle inheritance in plants. *Heredity.* 72, 132-140
- Rode A., Hartmann C., Falconet D., Lejeune B., Quétier F., Benslimane A., Henry Y., de Buyser J. (1987). Extensive mitochondrial DNA variation in somatic tissue cultures initiated from wheat immature embryos. *Curr. Genet.* 12, 369-376
- Rose R.J., Thomas M.R., Fitter J.T. (1990). The transfer of cytoplasmic and nuclear genomes by somatic hybridisation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 17, 303-321
- Rosenberg S.M., Bonnett H.T. (1983). Floral organogenesis in *Nicotiana tabacum*: a comparison of two cytoplasmic male-sterile cultivars with a male-fertile cultivar. *Am. J. Bot.* 70, 266-275
- Sakai T., Imamura J. (1992). Alteration of mitochondrial genomes containing *atpA* gene in the sexual progeny of cybrids between *Raphanus sativus* CMS line and *Brassica napus* cv. Westar. *Theor. Appl. Genet.* 84, 923-929

- Sanger F., Nicklens S., Coulson A. M. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5436-5437
- Schnable P.S., Wise R.P. (1994). Recovery of heritable, transposon-induced, mutant alleles of the *Rf2* nuclear restorer of T-cytoplasm Maize. *Genetics.* 136, 1171-1185
- Schnable P.S., Wise R.P. (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci.* 3, 175-180
- Schrauwen J.A.M., Mettenmeyer T., Croes A.F., Wullens G.J. (1996). Tapetum-specific genes: what role do they play in male gametophyte development. *Acta Bot. Neerl.* 45, 1-15
- Schuster W., Brennicke A. (1987). Plastid nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA. *EMBO J.* 6, 2857-2863
- Shirzadegan M., Palmer J.D., Christey M., Earle E.D. (1991). Patterns of mitochondrial DNA instability in *Brassica campestris* cultured cells. *Plant Mol. Biol.* 16, 21-37
- Siculella L., Palmer J.D. (1988). Physical and gene organisation of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atpA* gene. *Nucl. Acids Res.* 16, 3787-3799
- Siedow J.N., Umbach A.L. (1995). Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell.* 7, 821-831
- Small I., Isaac P.G., Leaver C.J. (1987). Stoichiometric differences in DNA molecules containing the *atpA* gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial genome diversity in maize. *EMBO J.* 6, 865-869
- Small I., Suffolk R., Leaver C. (1989). Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates. *Cell.* 58, 69-76
- Smart C.J., Monéger F., Leaver C.J. (1994). Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell.* 6, 811-825
- Spasova M., Monéger F., Leaver C.J., Petrov P., Atanassov A., Nijkamp H.J., Hille J. (1994). Characterisation and expression of the mitochondrial genome of a new type of cytoplasmic male-sterile sunflower. *Plant Mol. Biol.* 26, 1819-1831
- Stern D.B., Lonsdale D.M. (1982). Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12 kilobase DNA sequence in common. *Nature.* 299, 698-702
- Tang H.V., Pring D.R., Shaw L.C., Salazar R.A., Muza F.R., Yan B., Schertz K.F. (1995). Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. *Plant J.* 10, 123-135
- Tanno-Suenaga L., Ichikawa H., Imamura J. (1988). Transfer of the CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-recipient protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 76, 855-860
- Tracy R.L., Stern D.B. (1995). Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases. *Curr. Genet.* 28, 205-216

- Unsel M., Marienfeld J.R., Brandt P., Brennicke A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genet.* 15, 57-61
- Vedel F., Matieu C., Chétrit P., Pelletier G., Primard C. (1987). Mitochondrial DNA variation in the cytoplasmic male sterile somatic hybrids of *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 249-257
- Vedel F., Pla M., Vitart V., Gutierrez S., Chétrit P., De Paepe R. (1994). Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 601-618
- von Allmen J.M., Rottmann W.H., Gengenbach B.G., Harvey A.J., Lonsdale D.M. (1991). Transfer of methomyl and HmT-toxin sensitivity from T-cytoplasm maize to tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 229, 405-412
- Warkme H.E., Lee S.-L. J. (1979). Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *J. Hered.* 68, 213-222
- Weihe A., Hedtke B., Börner T. (1997). Cloning and characterisation of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucl. Acids Res.* 25, 2319-2325
- Whisson D.L., Scott N.S. (1985). Nuclear and mitochondrial DNA have sequence homology with a chloroplast gene. *Plant Mol. Biol.* 4, 267-273
- Wise R.P., Pring D.R., Gengenbach B.G. (1987). Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T) cytoplasm maize is associated with frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 2858-2862
- Wissinger B., Schuster W., Brennicke A. (1991). Trans-splicing in *Oenothera* mitochondria: *nadI* mRNAs are edited in exon and trans-splicing group II intron sequences. *Cell.* 65, 473-482
- Wolff K., Rogstad S.H., Schaal B.A. (1994). Population and species variations of minisatellite DNA in *Plantago*. *Theor Appl. Genet.* 87, 733-740
- Wolstenholme D.R. (1992). Animal mitochondrial DNA : Structure and evolution. In Wolstenholme D.R. and Jeon K.W. (ed), *Mitochondrial genomes*. Acad. Press, Inc., San Diego, California. 173-216
- Young E.G., Hanson M.R. (1987). A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell.* 50, 41-49
- Zabala G., Gabay-Laughnan S., Laughnan J.R. (1997). The nuclear gene *Rf3* affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R implicated in S-type male sterility in maize. *Genetics.* 147, 847-860
- Zabaleta E., Mouras A., Hernould M., Suharsono, Araya A. (1996). Transgenic male-sterile plant induced by an unedited *atp9* gene is restored to fertility by inhibiting its expression with antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 11259-11263

