

N° d'ordre
.....

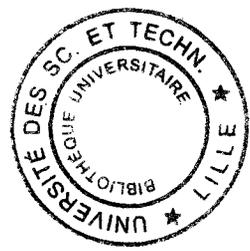
UNIVERSITE DE LILLE I
U.F.R DE BIOLOGIE

THESE
présentée
pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

par

Eric DUCOS



**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU
CYTOPLASME G INDUISANT LA STERILITÉ
MALE CHEZ LA BETTERAVE (*Beta vulgaris*)**

Soutenue le 24 octobre 2000 devant la commission :

- | | | | |
|-----|---------------------------|---|------------|
| Mme | Françoise BUDAR | INRA de Versailles (France) | Rapporteur |
| Mme | Rosine DE PAEPE | Université Paris-Sud, Orsay (France) | Rapporteur |
| M. | Marc BOUTRY | Université de Louvain-la-Neuve (Belgique) | |
| M. | Jean-Michel GRIENENBERGER | IBMP-CNRS de Strasbourg (France) | |
| M. | Pascal TOUZET | Université de Lille I (France) | |
| M. | Philippe VERNET | Université de Lille I (France) | |

Remerciements:

Je remercie Philippe Vernet et Myriam Valero de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein du laboratoire GEPV.

Je remercie également Joël Cuguen, Pascal Touzet de m'avoir accueilli dans l'équipe de "ceux qui aiment la betterave", ainsi que Pierre Saumitou-Laprade qui initia le sujet de cette thèse.

Un immense merci à Marc Boutry pour m'avoir ouvert les portes de FYSA d'innombrables fois. Merci de m'avoir fait profiter de votre expérience, de votre soutien et de votre réflexion qui m'ont énormément apporté scientifiquement et personnellement. Merci d'avoir toujours soutenu et d'avoir collaboré aussi activement à mon travail malgré des débuts très difficiles.

Je remercie Françoise Budar d'avoir suivi les aventures de la CMS G depuis le début. Merci d'avoir trouvé le doux nom de "petite-COX2" à "la sous-unité 2 de la cytochrome c oxydase tronquée des 8 acides aminés de son extrémité carboxyl-terminale". Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et enfin merci d'avoir déniché au fond d'un frigo les 2 µl d'anticorps anti-COX2 qui restaient à Versailles !

Je remercie Rosine De Paepe d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Merci d'avoir montré autant d'intérêt à ce travail. Enfin, merci pour tous les travaux sur la mitochondrie végétale et les mutants mitochondriaux qui, je dois le reconnaître, ont été une réelle source d'inspiration tout au long de cette thèse.

Merci à Jean-Michel Grienenberger d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens à vous remercier pour le don, car c'est un véritable don, de ce merveilleux anticorps anti-NAD9 !

Merci à tous ceux qui m'ont généreusement donné un peu de leur ADN, Benoit, Fred, Christelle... Merci à Valérie, Christine, Nina, Isabelle, Anne-Catheuleu pour tout le tralala! Merci à Anne pour ses conseils et sa gentillesse. Merci à Sandrine et Lionel pour les petits bouts de soleil et d'accent du pays qu'ils m'ont ramené à chaque retour de vacances...

Merci Anne-Marie d'avoir "respiré" avec moi, merci pour tes magnifiques coupes microscopiques, pour ta gentillesse et ton sourire. Merci à Monsieur Gand, grand maître incontesté de la séquence protéique et du Doudou (oui, je viendrai un jour!).

Un grand merci à ceux du groupe "EŚ !" pour m'avoir fait l'honneur de jouer avec eux d'inoubliables concerts. Un grand merci à tous ceux des "Spisek" et ceux des "Bistro-bistro" qui ont rendu ces années de thèse vraiment zajebiste(!) : Bounet, Counet, Patronska, Artem, Stephy, Benito, Mama-Anna, Gregounet, Jasína i Justyś.

Je remercie sincèrement la famille Jasiński pour sa gentillesse et sa générosité. Merci à Michał pour son soutien et son amitié, merci aussi à Szymek pour les parties de foot-ball.

Enfin, et surtout, Je dédie cette thèse à Laurence qui a traversé cette aventure avec moi, une de plus. Merci de m'avoir soutenu, tenu, porté et supporté avec force et compréhension sans discontinuer. Cette fois-ci c'est la fin, on y est arrivé, tous les deux ! En route vers de nouvelles aventures...

.....et quelques citations :

Cocus fan pas d'ascagas. (Proverbe occitan)

*Trust I seek, and I find in you, Every day for us something new
Open mind for a different view And nothing else matters. (Metallica)*

Wszyscy mamy źle w głowach, że żyjemy. (Electriczne gitary)

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

A : adénine	mA : milliampère
ADN : acide désoxyribonucléique	min : minute
ADP : adénosine diphosphate	ml : millilitre
APS : ammonium persulfate	MOPS : acide 3(N-Morpholino) propane réduit
ARN : acide ribonucléique	pH : potentiel hydrogène
ATP : adénosine triphosphate	p/v : poids par rapport au volume
BN : bleu natif	NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
BSA : albumine de sérum bovin	NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
Bis-tris : bis[2-hydroxyethyl]iminotris [hydroxymethyl]methane;2-bis[2-hydroxyethyl]amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propanediol	NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
C : cytosine	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
°C : degré Celsius	nm : nanomètre
Ci : curie	orf : open reading frame (phase ouverte de lecture)
Cyt c : cytochrome c	PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis (électrophorèse en gel de polyacrylamide)
cm : centimètre	pb : paire de base
CMS : cytoplasmic male sterility (stérilité mâle cytoplasmique)	PCR : polymérase chain reaction (réaction en chaîne de polymérase)
cpm : coup par minute	qsp : quantité suffisante pour
dATP : 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate	rpm : rotation par minute
dCTP : 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate	s : seconde
dGTP : 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate	SDS : sodium dodécylsulfate
dUTP : 2'-desoxyuridine 5'-triphosphate	T : thymine
dNTP : 2'-désoxynucléoside 5'-triphosphate	TCA : acide trichloroacétique
DDM : <i>n</i> -dodécylmaltoside	TEMED : N, N, N', N' tetraméthyléthylène diamine
DMSO : diméthyl sulfoxyde	TDAB : tétradécyltriméthylammonium
DO : densité optique	Tris : tris hydroxyméthyl aminométhane
DTT : dithiothréitol	urf : unknown reading frame (phase de lecture inconnue)
EDTA : acide éthylèndiaminotétraacétique	UV : ultra-violet
EGTA : acide éthylèneglycol-bis-(β-aminoéthyléther) N,N,N',N'-tétraacétique	V : volt
g : unité de gravitation	v/v : volume à volume
G : guanine	µg : microgramme
GTP : guanosine triphosphate	µl : microlitre
h : heure	µM : micromolaire
HEPES : acide N-[hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic]	
kb : kilobase	
kDa : kilodalton	
M : molaire	

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION	4
I - PRESENTATION DE LA STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE	4
1-Généralités sur la CMS.....	4
1-1-Utilisation de la CMS en amélioration des plantes.....	5
1-2-La stérilité mâle en populations naturelles	5
2-Exemples détaillés de deux CMS	6
2-1-CMS T du maïs : implication d'une protéine chimérique T-URF13.....	6
2-2-CMS IS1112C du sorgho : altération de la chaîne respiratoire	8
3-Particularités de quelques CMS.....	9
3-1-Le haricot : <i>orf239</i>	9
3-2-Le pétunia : <i>urfS</i>	9
3-3-La fèveole.....	10
4-Conclusion.....	10
II - LA MITOCHONDRIE VÉGÉTALE	12
1-Le génome mitochondrial.....	12
2-Expression du génome mitochondrial	14
3-Le métabolisme mitochondrial.....	15
3-1-Aspects de la biochimie de la mitochondrie.....	15
3-2-La chaîne respiratoire mitochondriale	16
4-Exemples de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire	18
4-1-Les mutants mitochondriaux	18
4-2-Les mutants transgéniques et nucléaires.....	20
III – BILAN ET DISCUSSION	21
IV -GÉNÉRALITÉ SUR LA BETTERAVE ET VARIABILITÉ CYTOPLASMIQUE	22
1-Introduction sur la betterave (<i>Beta vulgaris</i>).....	22
2-Variabilité mitochondriale au sein de <i>Beta vulgaris</i>	23
3-Les différentes CMS dans la betterave sucrière.....	24
3-1-La CMS <i>Owen</i> de la betterave sucrière	24
3-2-Le cytoplasme <i>G</i> , nouvelle source de CMS et état des lieux.....	26
OBJECTIFS DE LA THESE	28
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES	29
I - MATERIEL VEGETAL	29
1-Betteraves cultivées (<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i>).....	29
2-Betteraves sauvages (<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i>)	30
II – METHODES D'ANALYSES PROTEIQUES	30
1-Préparation des mitochondries.....	30
1-1-Solutions.....	31
1-2-Méthode.....	31
2-Synthèse <i>in organello</i>	32
2-1-Solutions.....	32
2-2-Méthode.....	33
2-3-Expérience de "pulse-chase"	33
2-4-Comptage de la radioactivité incorporée	34
3-Dosage de la quantité de protéine.....	34

4-Electrophorèses en gels de polyacrylamide	35
4-1-Gel dénaturant en présence de SDS (SDS-PAGE)	35
4-1-1-Composition du gel	35
4-1-2-Préparation des échantillons	36
4-1-3-Conditions d'électrophorèses	36
4-1-4-Conditions de transfert	36
4-2-Electrophorèse à deux dimensions base/acide (SDS/TDAB-PAGE)	36
4-2-1-Composition du gel acide	37
4-2-2-Préparation des échantillons	37
4-2-3-Conditions d'électrophorèse acide	38
4-2-4-Conditions de transfert acide	38
4-3-Gel non-dénaturant (bleu natif PAGE)	38
4-3-1-Composition du gel	38
4-3-2-Préparation des échantillons	39
4-3-3-Conditions d'électrophorèse	39
4-3-4-Conditions de transfert	40
4-3-5-Deuxième dimension dénaturante : (bleu natif) SDS-PAGE	40
5-Coloration des protéines	40
5-1-Coloration des gels de protéines	40
5-1-1-Coloration au bleu de Coomassie	40
5-1-2-Coloration au nitrate d'argent	40
5-2-Coloration des membranes après électro-transfert	41
5-2-1-Coloration à l'amido-black	41
5-2-2-Coloration au Rouge Ponceau	41
6-Immunodétection des protéines (Western-blot)	41
7-Mesure des activités enzymatiques	42
7-1-Obtention de particules submitochondriales	42
7-2-Activité NADH:ubiquinone oxydoréductase (Complexe I)	42
7-2-1-Mesure de l'oxydation du NADH	42
7-2-2-Mesure de la réduction du cytochrome <i>c</i>	43
7-3-Activité cytochrome <i>c</i> oxydase (Complexe IV)	43
III - METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	44
1-Analyses des acides nucléiques : ADN	44
1-1-Extraction d'ADN total de plante	44
1-2-Digestion d'ADN	44
1-3-Electrophorèse de gel d'ADN	45
1-4-Transfert de gel d'ADN	45
1-5-Hybridation (Southern-blot)	45
1-5-1-Préparation des sondes et marquage froid	45
1-5-2-Conditions d'hybridations	46
1-5-3-Révélation	47
1-6-Séquençage d'ADN	47
1-6-1-Amplification par PCR	47
1-6-2-PCR inverse (iPCR)	48
1-6-3-Clonage des produits d'amplification PCR	49
1-6-4-Séquençage automatique d'ADN	50
1-7-Analyse des mutations ponctuelles par PCR-restriction	51
2-Analyses des acides ribonucléiques : ARN	51
2-1-Extraction d'ARN totaux	51
2-2-Electrophorèse de gel d'ARN	52
2-3-Transfert de gel d'ARN	53
2-4-Hybridation (Northern-blot)	53
2-4-1-Préparation des sondes et marquage radioactif	53
2-4-2-Conditions d'hybridation	53
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS	55
I – PRÉAMBULE ET DESCRIPTION PHENOTYPIQUE DE LA CMS <i>G</i>	55
1-Phénotype générale de la CMS <i>G</i> en betterave sucrière	55

2-Description des fleurs stériles et fertiles.....	55
3-Taux de fertilité de la CMS <i>G</i> chez les betteraves sauvages	56
II – ANALYSE DES PROTEINES MITOCHONDRIALES DU CYTOPLASME <i>G</i>	58
1-Identification de polypeptides mitochondriaux associés au cytoplasme <i>G</i>	58
1-1-Comparaison des profils d'expression protéique mitochondriale en synthèse <i>in organello</i> des cytoplasmes <i>Nv</i> et des CMS <i>Owen</i> , <i>E</i> et <i>G</i> de <i>Beta vulgaris</i>	58
1-2-Caractérisation des polypeptides variants.....	59
1-3-Identification des polypeptides variants	60
2-Caractérisation moléculaire des sous-unités <i>nad9</i> et <i>cox2</i> du cytoplasme <i>G</i>	62
2-1-Analyse des séquences génomique et protéique de <i>nad9</i>	62
2-1-1-Séquence génomique du gène <i>nad9</i>	62
2-1-2-Modification de la structure primaire prédite de la protéine NAD9.....	65
2-2-Analyse des séquences génomique et protéique de <i>cox2</i>	66
2-2-1-Séquence génomique du gène <i>cox2</i>	66
2-2-2-Modification de la structure primaire prédite de la protéine COX2	67
2-3-Spécificité des modifications du cytoplasme <i>G</i>	68
3-Conclusions	70
III – LA CHAÎNE RESPIRATOIRE DU CYTOPLASME <i>G</i>	71
1-Localisation et fonction de <i>grande-NAD9</i> et <i>petite-COX2</i>	71
1-1-NADH:ubiquinone oxydoréductase (Complexe I)	71
1-1-1-Structure et rôle du complexe I	71
1-1-2-Intégrité du complexe I dans la CMS <i>G</i>	72
1-1-3-Mesure de l'activité enzymatique du complexe I.....	72
1-1-4-Conclusions	74
1-2-Cytochrome <i>c</i> oxydase (Complexe IV)	75
1-2-1-Structure et fonctionnement du complexe IV.....	75
1-2-2-Intégrité du complexe IV dans la CMS <i>G</i>	76
1-2-3-Mesure de l'activité enzymatique du complexe IV.....	77
1-2-4-Conclusions	78
2-Particularités de la chaîne respiratoire du cytoplasme <i>G</i>	80
2-1-Oxydase alterne (AOX).....	80
2-1-1-Fonction et génétique de l'AOX	80
2-1-2-Niveau d'expression de l'AOX dans le cytoplasme <i>G</i>	81
2-1-3-Bilan énergétique du cytoplasme <i>G</i>	81
2-2-Avantages potentiels du cytoplasme <i>G</i>	83
2-2-1-Régulation de l'AOX	83
2-2-2-Résistance au froid	84
2-2-3-Limitation de la production des espèces oxygénées réactives (ROS).....	85
3-Hypothèses sur les mécanismes de la stérilité mâle cytoplasmique <i>G</i>	85
3-1-Implication du complexe I : <i>grande-NAD9</i>	86
3-2-Implication du complexe IV : <i>petite-COX2</i>	87
3-3-Discussion	87
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	89
BIBLIOGRAPHIE	92
ANNEXES.....	104
ANNEXE I : Cartographie du génome mitochondrial de betterave (Kubo <i>et al.</i> 2000)	
ANNEXE II : Article I, accepté dans <i>Theoretical and Applied Genetics</i>	
ANNEXE III : Proceeding du congrès international "Plant Mitochondria" de juin 1998 à Aronsborg (Suède)	
ANNEXE IV : Article II, en soumission pour <i>The Plant Journal</i>	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les systèmes de reproduction des plantes supérieures suscitent depuis longtemps l'intérêt des botanistes, des généticiens et des physiologistes pour leur diversité. La reproduction sexuée est marquée par une très grande variété phénotypique des organes reproducteurs, le brassage de l'information génétique par la méiose et l'implication de mécanismes moléculaires complexes spécifiques à cette fonction. Parmi les espèces végétales pratiquant la reproduction sexuée, plusieurs voies sont utilisées pour la transmission des gènes. Les plantes dioïques portent les fonctions mâle et femelle sur des individus différents alors que les hermaphrodites réunissent sur un même individu ces deux fonctions. Certaines espèces végétales font coexister les individus hermaphrodites et femelles (appelées aussi mâle-stériles) au sein d'une même population naturelle. Dans la plupart des cas étudiés, le caractère mâle-stérile étant transmis uniquement par la voie femelle, donc le cytoplasme de l'ovule, ce phénomène a été appelé stérilité mâle cytoplasmique (ou CMS pour *cytoplasmic male sterility*).

I - PRESENTATION DE LA STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE

1-Généralités sur la CMS

La stérilité mâle cytoplasmique a été décrite chez plus de 150 espèces végétales (Laser et Lersten 1972, Levings III et Vasil 1995, Mackenzie *et al.* 1994). La moitié de ces CMS a été observée dans des **populations naturelles**, environ 20% sont apparues par des croisements intraspécifiques et le reste a été obtenu par des croisements interspécifiques (Frank 1989). Plus récemment des méthodes de fusion de protoplastes entre différents genres (Rambaud *et al.* 1993) ou espèces (Kumashiro *et al.* 1988) végétales ont été développées, permettant l'obtention de CMS à partir des plantes régénérées. La CMS a été principalement étudiée au niveau moléculaire sur des espèces végétales cultivées pour l'intérêt qu'elle représente en amélioration des plantes.

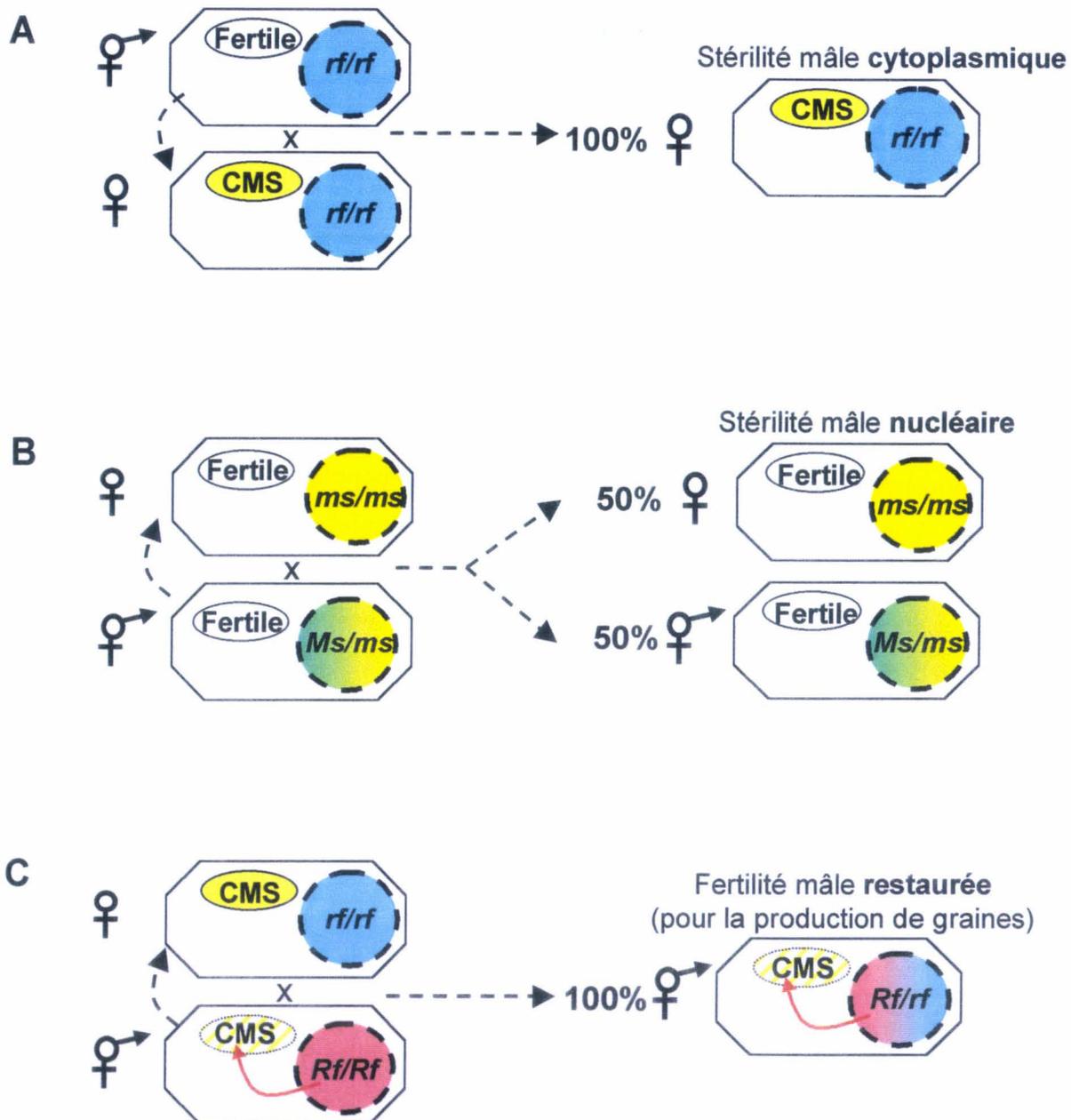


Figure 1 : La CMS utilisée en agronomie. **A.** La CMS croisée avec une lignée mainteneuse de la stérilité. **B.** La stérilité mâle nucléaire avec *ms* l'allèle récessif de stérilité. **C.** La restauration de la CMS pour la production de graines, *Rf* allèle restaurateur dominant.

1-1-Utilisation de la CMS en amélioration des plantes

La stérilité mâle cytoplasmique est très largement utilisée en agriculture pour l'amélioration des plantes et la production de semences. Les plantes mâle-stériles ne produisant pas de pollen, elle permet d'éviter l'autofécondation et facilite considérablement la production de graines hybrides. Afin d'assurer le **maintien** des lignées mâles-stériles, les plantes sont pollinisées avec le pollen de plantes fertiles ne possédant pas de facteur stérilisant cytoplasmique, ni de gène de restauration (Figure 1A). Le cytoplasme n'étant transmis que par la voie maternelle, la descendance obtenue en F1 est 100% stérile, ce qui représente un avantage considérable par rapport aux stérilités nucléaires qui ne produisent que 50% de mâle-stérile (Figure 1B). Les croisements récurrents entre les plantes mâle-stériles (F1) et les lignées maintenant la stérilité permet d'obtenir des **couples CMS/mainteneurs** de plantes avec des cytoplasmes différents et un génome nucléaire très proche, sélectionné sur des critères agronomiques.

Dans le cadre d'espèces cultivées pour la production de leurs graines, il est nécessaire de croiser les CMS avec des plantes capables de restaurer la fertilité. Cette **restauration** (Figure 1C) est apportée par le génome nucléaire (*Rf/rf*) qui vient contrecarrer l'action des facteurs stérilisant cytoplasmiques et, par conséquent, rétablir la fonction mâle et la production de graines.

1-2-La stérilité mâle en populations naturelles

La présence de plantes mâle-stériles coexistant avec des plantes hermaphrodites n'est pas un phénomène rare dans les populations naturelles, puisqu'elle est, par exemple, rencontrée chez 7,5 % des angiospermes de la flore européenne (Delannay 1978). Il est à noter que dans les populations naturelles, l'étendue de ce phénomène varie selon les espèces étudiées (Figure 2).

Le maintien de la stérilité mâle apparaît comme un paradoxe. En effet, les plantes mâle-stériles ne pouvant transmettre leurs gènes que par les graines sont défavorisées par rapport aux hermaphrodites qui transmettent leurs gènes par deux voies différentes, les graines et le pollen.

Espèce	Minimum	Maximum	Références
<i>Daucus carota</i>	0	15	Ronfort, Saumitou-Laprade <i>et al.</i> , 1995
<i>Plantago lanceolata</i>	4	22	Van Damme, 1984
<i>Plantago lanceolata</i>	2	31	Krohne, Baker <i>et al.</i> , 1980
<i>Plantago coronopus</i>	5	27	Koelewijn, 1993
<i>Geranium maculatum</i>	0	24	Ågren & Willson, 1991
<i>Nemophila menziesii</i>	0	26	Ganders, 1978
<i>Scandia geniculata</i>	7	25	Webb, 1979
<i>Gingidia</i> sp.	0	31	idem.
<i>Lignocarpa carnolusa</i>	0	41	idem.
<i>Hebe strictissima</i>	1	34	Delph, 1990
<i>Fuschia excorticata</i>	4	40	Godley, 1955
<i>Bidens</i> sp.	9	44	Sun & Ganders, 1986
<i>Cortaderia richardii</i>	0	53	Connor, 1963
<i>Sarcocornia quinqueflora</i>	0	53	Connor, 1984
<i>Cucurbita foetidissima</i>	21	65	Kohn, 1989
<i>Thymus vulgaris</i>	5	95	Domnée, Assouad <i>et al.</i> , 1978
<i>Thymus zygis</i>	17	87	Manicacci, 1993
<i>Thymus mastichina</i>	41	99	id.
<i>Beta maritima</i>	19	62	Boutin, Pannenbecker <i>et al.</i> , 1987
<i>Beta maritima</i>	0	76	Cuguen, Wattier <i>et al.</i> , 1994

Figure 2 : Tableau illustrant la variation du pourcentage de femelles chez quelques espèces gynodioïques (d'après Cuguen *et al.* 1994).

Différents modèles ont été proposés pour expliquer le maintien de ce polymorphisme sexuel, avec des taux de femelles aussi élevés. Succinctement, le maintien de la stérilité mâle en population peut s'expliquer par:

- un déterminisme nucléo-cytoplasmique de la stérilité mâle, avec des facteurs stérilisants cytoplasmiques et des facteurs nucléaires restaurateurs de la fertilité mâle;
- un avantage en fécondité des plantes mâle-stériles du fait d'une ré-allocation des ressources de la fonction mâle et/ou un avantage en survie se traduisant au final par une production de graines supérieure à celle des hermaphrodites;
- un coût associé à la restauration désavantageant des individus portant les allèles de restauration.

Dans ce contexte, la CMS apparaît moins comme un dysfonctionnement de la mitochondrie, qu'une caractéristique du régime de reproduction d'un grand nombre d'espèces. Passée au crible de la sélection naturelle, elle peut être considérée comme le fruit d'un conflit d'intérêt entre deux génomes transmis de manière différente: le génome mitochondrial qui en bloquant la voie mâle facilite sa propre transmission (dès qu'il y a un avantage femelle), le génome nucléaire qui contrecarre l'effet stérilisant de la mitochondrie en rétablissant cette voie mâle.

2-Exemples détaillés de deux CMS

2-1-CMS T du maïs : implication d'une protéine chimérique T-URF13

La stérilité mâle cytoplasmique du maïs Texas a été décrite pour la première fois en 1952 par Rogers et Edwardson. Apparue spontanément dans la lignée de maïs *Golden June*, elle est à ce jour la plus étudiée et les mécanismes moléculaires induisant la stérilité mâle sont les mieux compris. Outre la stérilité mâle, le cytoplasme T confère aussi la sensibilité aux toxines *BmT* et *PmT* des champignons *Bipolaris maydis* et *Phyllosticta maydis*, respectivement, ainsi qu'au méthomyl, un insecticide.

La comparaison des profils d'expression protéique mitochondriale entre le cytoplasme normal (fertile) et le cytoplasme T (stérile) a révélé la présence d'une protéine additionnelle de 13 kDa dans ce dernier (Forde *et al.* 1978). Appelée T-URF13 (Texas *unknown reading frame* 13 kDa), Dewey (1987) et Wise (1987) montrent qu'elle est codée

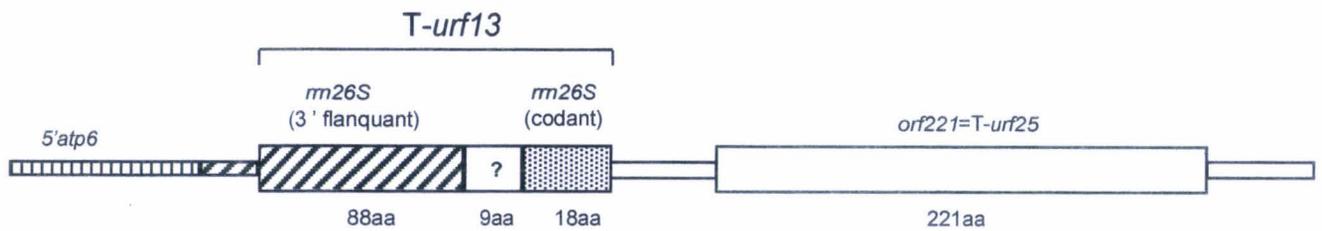


Figure 3 : Organisation chimérique du gène *T-urf13*

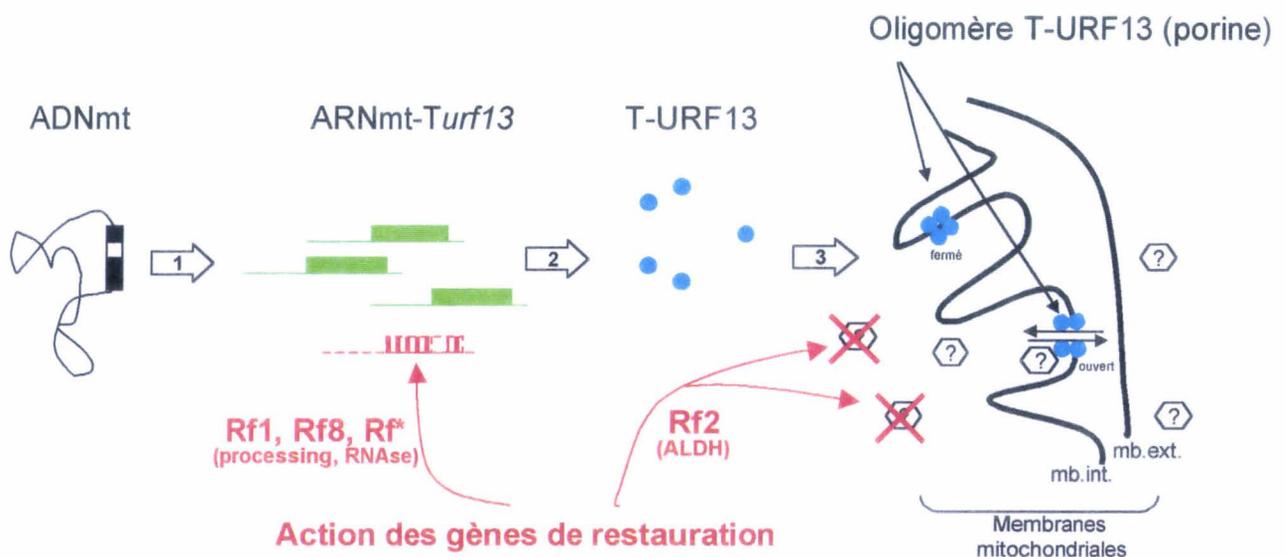


Figure 4 : Schéma des mécanismes moléculaires de la CMS du maïs *Texas* et de la restauration. Le gène *T-urf13* est transcrit (1), puis traduit (2). La protéine T-URF13 s'associe en oligomères et s'insère dans la membrane interne mitochondriale (3) pour former une porine. Fermée, elle n'altère pas le fonctionnement de la mitochondrie. Ouverte par interaction avec un facteur spécifique de l'anthere (?), elle s'ouvre et détruit le gradient électro-chimique mitochondriale. La restauration réduit le taux de transcrits *T-urf13* (*Rf1*, *Rf8*, *Rf**) et réduit l'accumulation de facteur déclenchant l'ouverture de la porine (*Rf2*).

par un gène chimérique créé par recombinaisons intragénomiques associant les séquences 3' non codante du gène de l'ARN ribosomique 26S (*rrn26S*), 9 codons non identifiés et une partie de la séquence codante du gène *rrn26S* (Figure 3). Le gène T-*urf13* est co-transcrit avec l'*orf221* (Dewey *et al.* 1986) qui code pour une protéine conservée dans la plupart des espèces végétales supérieures (Prioli *et al.* 1993). La protéine T-URF13 posséderait trois hélices membranaires et a été localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette protéine chimérique s'associe en oligomères pour former une porine mitochondriale (Korth *et al.* 1991). La présence de T-URF-13 a été détectée dans tous les tissus (Newton et Walbot 1985) mais elle n'interfère qu'au niveau du développement du grain de pollen. L'hypothèse qu'un facteur spécifique de l'anthere vienne interagir avec la porine T-URF13 a été renforcée par le clonage et l'identification du gène de restauration *Rf2* codant pour une aldéhyde déshydrogénase (Cui *et al.* 1996). En effet, pendant le développement de l'anthere la fermentation alcoolique augmente l'accumulation d'acétaldéhyde dans les tissus floraux (op den Camp et Kuhlemeier 1997). Cet intermédiaire de la fermentation pourrait alors être le facteur déclenchant l'ouverture de la porine T-URF13 et la stérilité mâle (Figure 4).

La restauration de la fertilité combine l'action du gène *Rf2* avec celle d'un des trois autres gènes de restauration : *Rf1*, *Rf8* ou *Rf**. Les gènes *Rf1* (Wise *et al.* 1996), *Rf8* et *Rf** (Dill *et al.* 1997), situés à des *locus* indépendants, affectent différemment le profil transcriptionnel de T-*urf13* et diminuent son accumulation. Dans le cas de *Rf1*, son action permet de réduire de plus de 80% la quantité de protéine URF13 dans les tissus végétatifs (Kennell et Pring 1989). A ce jour, *Rf2* reste le seul gène de restauration cloné (par *transposon-tagging*) et séquencé (Cui *et al.* 1996). La séquence a révélé une forte homologie avec une aldéhyde déshydrogénase de mammifère, puis de tabac (op den Camp et Kuhlemeier 1997). L'action de *Rf2* n'est pas encore clairement établie. Toutefois sa fonction potentielle suggère qu'il puisse participer, pendant le développement du pollen, à la détoxification des intermédiaires de la fermentation alcoolique comme l'acétaldéhyde. Ce dernier serait alors oxydé en acétate par *Rf2* et, n'interférant plus avec la porine T-URF13, l'intégrité des mitochondries pendant la gamétogénèse mâle serait préservée.

Enfin, alors que *Rf1* n'est présent que très rarement dans les lignées de maïs, le fait que *Rf2* soit présent dans presque toutes (Schnable et Wise 1994) suggère que ce gène soit impliqué dans des fonctions sans lien avec la restauration de la CMS, comme le métabolisme énergétique ou la biogenèse (op den Camp et Kuhlemeier 1997).

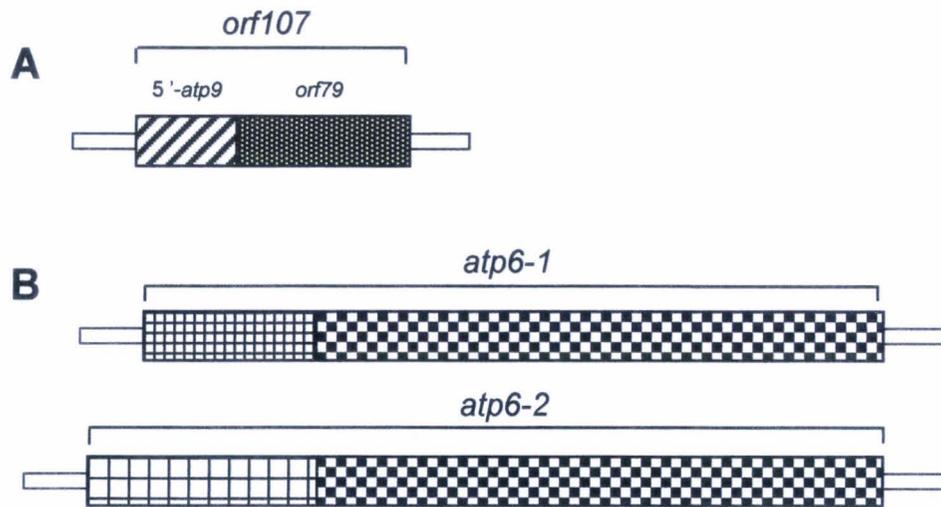
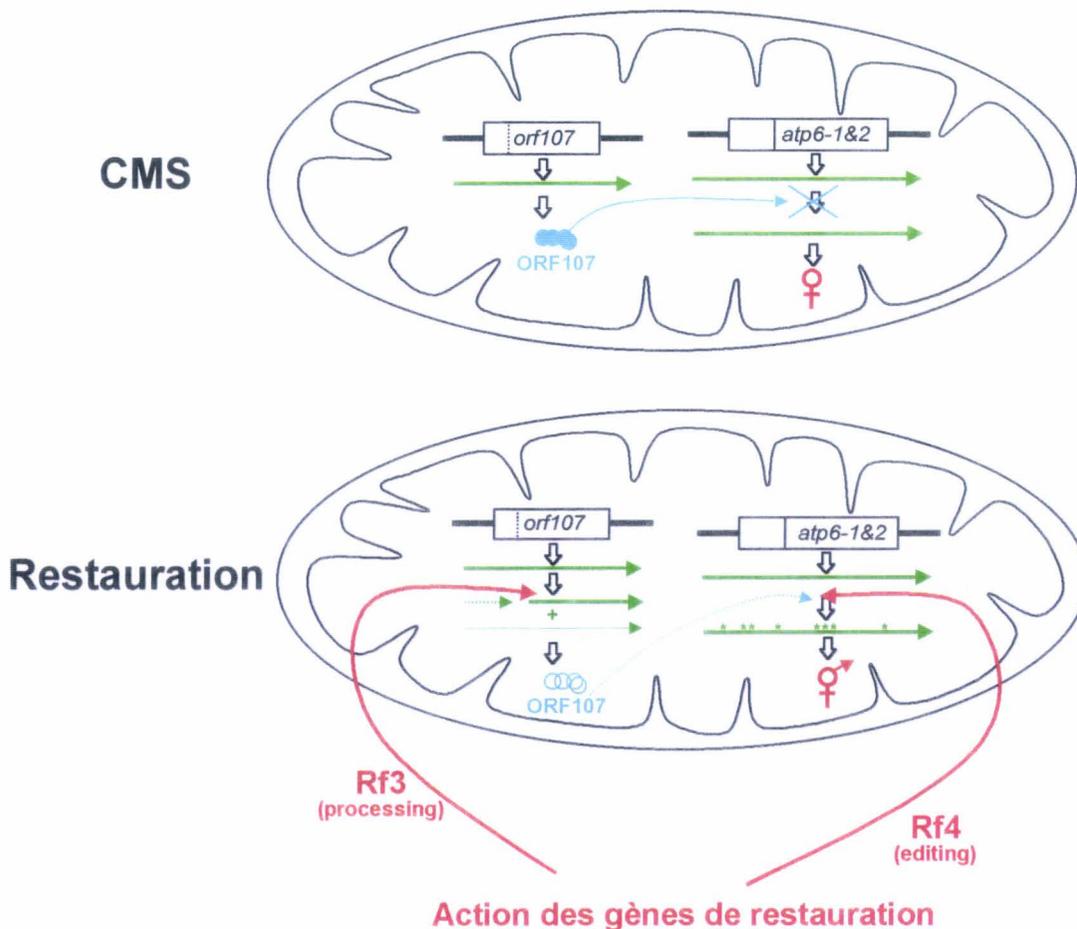


Figure 5 : A. Représentation de l'*orf107* du cytoplasme IS1112C de *Sorghum bicolor* (L.), d'après Pring *et al.* (1999). B. Représentation de deux copies du gène codant pour la sous-unité 6 de la F0F1 ATP synthase du cytoplasme IS1112C de *Sorghum bicolor* (L.), d'après Howad *et al.* (1997).



Action des gènes de restauration

Figure 6 : Schéma des mécanismes moléculaires de la CMS du cytoplasme IS1112C de *Sorghum bicolor* (L.) et de la restauration (d'après Howad *et al.* 1999). **CMS :** la protéine codée par l'*orf107* prévient l'editing des transcrits *atp6* qui entraîne un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire dans l'anthere et la perte de la fonction mâle. **Restoration :** *Rf3* clive les transcrits de l'*orf107* réduisant ainsi la présence de la protéine ORF107. Les transcrits *atp6* sont édités (*) dans l'anthere sous l'action du gène *Rf4*. La protéine ATP6 "restaurée" rétablit le fonctionnement normal de la chaîne respiratoire et la fonction mâle.

2-2-CMS IS1112C du sorgho : altération de la chaîne respiratoire

Le sorgho (*Sorghum bicolor* L.) est, comme le maïs, une espèce cultivée pour ses graines. La CMS et la restauration sont donc couramment utilisées dans la sélection et la culture de cette céréale. Plus de sept sources de CMS ont été identifiées en différenciant les caractéristiques génétiques de la restauration pour chacune d'elles (Pring *et al.* 1995, Worstell *et al.* 1984, Xu *et al.* 1995). Certains de ces cytoplasmes ont aussi été caractérisés par leur ADN mitochondrial.

Le cytoplasme IS1112C, du groupe de CMS A3, est un des mieux caractérisés au niveau moléculaire. L'analyse du génome mitochondrial a révélé la présence de plusieurs *orf* additionnelles (Tang *et al.* 1996a). Mais l'*orf107*, un gène chimérique codant potentiellement pour une protéine de 12 kDa (Figure 5A), a suscité le plus d'intérêt du fait de la modification de son profil de transcription dans les plantes restaurées (Tang *et al.* 1996b). Par ailleurs, le cytoplasme IS1112C se caractérise aussi par la présence de deux copies réarrangées du gène codant pour la sous-unité 6 de l'ATP synthase mitochondriale : *atp6-1* et *atp6-2* (Figure 5B). Les transcrits *atp6* ne sont pas (ou moins) édités dans les anthères des plantes stériles (Howad et Kempken 1997) et dans les plantes restaurées la fréquence d'édition a été corrélée avec le taux de grains de pollen viables (Pring *et al.* 1999). La protéine issue de l'ARN non édité comporterait des changements d'acides aminés qui ont été, chez l'homme, identifiés comme responsables de maladies mitochondriales (Kempken *et al.* 1998). Toutefois, dans le cas du sorgho, la présence ou non dans l'anthère de la protéine ATP6 modifiée n'a pas été démontrée. Par conséquent, l'expression de la CMS a été corrélée soit à l'absence de la sous-unité ATP6 dans l'anthère, soit à la présence de cette sous-unité dont les modifications de séquences seraient incompatibles avec le fonctionnement de l'ATP synthase mitochondriale.

Le lien entre l'*orf107*, les deux copies d'*atp6* et l'expression de la CMS n'a pas encore été clairement établi chez le sorgho. Mais l'approche génétique a montré que l'action de deux gènes nucléaires était nécessaire pour la restauration de la fertilité dans cette CMS. *Rf3* semble agir sur le profil transcriptionnel de l'*orf107* et son accumulation (Tang *et al.* 1998). *Rf4* serait impliqué dans l'édition des copies du gène *atp6* spécifiquement dans l'anthère, peut-être en inhibant l'action du polypeptide ORF107 (Howad et Kempken 1997, Pring *et al.* 1998). Howad *et al.* (1999) proposent un modèle dans lequel le produit de l'*orf107* préviendrait l'édition d'*atp6* spécifiquement dans

l'anthère ce qui engendrerait un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire spécifique à ce tissu et aboutirait à la stérilité mâle (Figure 6).

3-Particularités de quelques CMS

3-1-Le haricot : *orf239*

Un fragment de 3 kb (*pvs*) différenciant les profils de restriction d'ADN mitochondrial des lignées fertiles et de la lignée stérile "Sprite" de *Phaseolus vulgaris* a permis d'isoler l'*orf239* propre au cytoplasme stérile (Chase et Ortega 1992). Cette *orf* code pour une protéine de 27 kDa (ORF239). Cette protéine est **dégradée dans les tissus végétatifs** (Abad 1995) et n'est détectée que dans les tissus de l'anthère au niveau des couches de callose pendant la gamétogenèse mâle (He *et al.* 1995), indiquant par ailleurs, que **la protéine synthétisée est ensuite localisée à l'extérieur de la mitochondrie.**

L'action du gène de restauration *Fr* est irréversible et est associée à la perte d'un fragment d'ADN mitochondrial subgénomique de 25 kb comprenant l'*orf239* (Janska et Mackenzie 1993). Un autre mode de restauration semble corrélérer la diminution du transcrite de l'*orf239* avec la présence du gène de restauration *Fr2* (Chase 1994).

He (He *et al.* 1996) a apporté la **preuve définitive** de l'implication de l'ORF239 dans l'expression de la stérilité mâle avec des tabacs transgéniques exprimant la protéine ORF239 dans l'anthère, avec ou sans adressage mitochondrial. Les transgènes présentent des anomalies semblables à celles observées sur les anthères des fleurs du haricot et sont mâle-stériles.

3-2-Le pétunia : *urfS*

La CMS chez le pétunia a été reliée à la présence d'un gène de fusion (*pcf*) associant des fragments du gène codant pour la sous-unité 9 de l'ATP synthase mitochondriale (*atp9*), la sous-unité 2 de la cytochrome *c* oxydase (*cox2*) et un fragment d'origine inconnue (*urfS*) (Young et Hanson 1987). Le gène *pcf* est co-transcrit avec la sous-unité 3 de la NADH:ubiquinone oxydoréductase (*nad3*) et la protéine 12 de la petite sous-unité ribosomique (*rps12*) (Rasmussen et Hanson 1989). L'*orf pcf* est traduite en **une protéine de 43 kDa maturée en une protéine de 25 kDa** correspond à la région *urfS* du

gène *pcf* (Nivison et Hanson 1989). L'action de cette protéine reste énigmatique. Toutefois sa présence semble **modifier le métabolisme mitochondrial** des plantes stériles. En effet, l'activité de l'oxydase alterne reste extrêmement faible dans des suspensions cellulaires et les jeunes anthères comparées aux plantes fertiles et restaurées (Connett et Hanson 1990). La restauration semble aussi réduire la quantité de la protéine de 25 kDa dans les organes mâles (Nivison et Hanson 1989).

3-3-La fève

La stérilité mâle du cytoplasme '447' de *Vicia faba* n'a pas été corrélée à un dysfonctionnement mitochondrial, mais à la **présence de vésicules membranaires** contenant un **ARN double brin** de plus de 15 kb dans le cytoplasme des cellules de tous les tissus des plantes stériles (Lefebvre *et al.* 1990). La séquence de cet ARN a révélé qu'il codait potentiellement pour une hélicase de **type viral** et une ARN polymérase ARN-dépendante. Par ailleurs, des homologies de séquence de ces protéines avec une β 1-3 glucanase pourrait être responsable de la stérilité mâle par interférences avec les glucanases impliquées dans la formation du dépôt de callose dans l'anthère (Pfeiffer 1998). L'effet des gènes de restauration se traduit par une disparition irréversible de l'ARN double brin et des vésicules membranaires dans le cytoplasme.

4-Conclusion

Dans beaucoup de cas, la stérilité mâle cytoplasmique a été associée à un dysfonctionnement de la mitochondrie pendant la gamétogenèse mâle liée à la présence d'une protéine mitochondriale additionnelle dans les plantes stériles, souvent codée par un gène chimérique (Tableau 1). Dans l'ensemble, la moitié de ces polypeptides partage les mêmes caractéristiques: ils ont une taille inférieure à 30 kDa, ils sont hydrophobes et sont exprimés de façon constitutive. Toutefois, les mécanismes moléculaires de la stérilité mâle semblent propres à chaque polypeptide et il est difficile d'établir des règles générales quant aux modes d'action de ces gènes pendant la gamétogenèse mâle.

Plante	Cytoplasme	Gène	Protéine	Références
Haricot	<i>sprite</i>	<i>orf239</i>	27 kDa	(Chase et Ortega 1992, He <i>et al.</i> 1996)
Pétunia	<i>petunia-CMS</i>	<i>urfs</i>	25 kDa	(Nivison <i>et al.</i> 1994, Young et Hanson 1987)
Tournesol	<i>PET1</i>	<i>orfH522</i>	16 kDa	(Laver <i>et al.</i> 1991, Monéger <i>et al.</i> 1994)
Tabac	<i>bigelovii</i>	<i>orf38/221</i>	?	(Bergman <i>et al.</i> 1994)
Brassicassées	<i>nap</i>	<i>orf222/orf139</i>	?	(L'Homme <i>et al.</i> 1997)
	<i>polima</i>	<i>orf224</i>	25 kDa	(Handa <i>et al.</i> 1995, Singh et Brown 1993)
	<i>ogura</i>	<i>orf138</i>	19 kDa	(Bonhomme <i>et al.</i> 1992, Grelon <i>et al.</i> 1994)
	<i>tounefortii</i>	<i>orf263</i>	32 kDa	(Landgren <i>et al.</i> 1996)
Maïs	T (<i>Texas</i>)	<i>urf13</i>	13 kDa	(Cui <i>et al.</i> 1996, Levings III 1993)
	S (<i>USDA</i>)	<i>orf355</i>	42 kDa	(Kamps <i>et al.</i> 1996, Laughnan et Gabay-Laughnan 1983)
	C (<i>Charrua</i>)	<i>atp6/atp9/cox2</i>	17 kDa	(Dewey <i>et al.</i> 1991, Laughnan et Gabay-Laughnan 1983)

Tableau 1 : Cas des CMS impliquant des gènes chimériques.

Par ailleurs, le séquençage complet du génome mitochondrial des végétaux supérieurs comme *Arabidopsis thaliana* (Unsold *et al.* 1997) et récemment *Beta vulgaris* (Kubo *et al.* 2000) a révélé l'existence de nombreuses *orfs*, souvent de nature chimérique (Marienfeld *et al.* 1997), sans lien avec la stérilité mâle. La présence d'*orfs* **additionnelles** dans les cytoplasmes stériles n'est donc pas systématiquement associée à la CMS mais semble être simplement le résultat de réarrangements du génome mitochondrial. Enfin, l'**effet pléiotrope** des gènes de restauration (Li *et al.* 1998), qui se traduit dans certains cas par une modification du profil de transcription de plusieurs gènes mitochondriaux sans lien avec la CMS (Singh *et al.* 1996, Wen et Chase 1999), rend extrêmement difficile l'identification des facteurs mitochondriaux impliqués dans l'expression de phénotype mâle-stérile sur la seule base de ces critères.

Chez les plantes d'intérêt agronomique, la CMS peut être aussi la conséquence d'alloplasmie lorsque la compatibilité entre le cytoplasme et le noyau n'est pas parfaite après des croisements intergénériques ou interspécifiques, comme par exemple chez le blé (Laser *et al.* 1995), le riz (Kyojuka *et al.* 1989), le sorgho (Worstell *et al.* 1984), ou encore le tabac (Hakansson et Glimelius 1991). La stérilité mâle peut apparaître spontanément lors de ces croisements traduisant un mauvais fonctionnement du cytoplasme dans un contexte nucléaire. Les descendants dont les incompatibilités génomiques sont restreintes au

développement floral sont sélectionnés. Bien que des réarrangements du génome mitochondrial résultent souvent de ces croisements, dans certains cas le fond nucléaire des plantes hybrides générées ne permet pas d'assurer l'expression correcte de tous les gènes mitochondriaux, en particulier dans les fleurs. Dans ce cas particulier, la stérilité mâle cytoplasmique est plutôt associée à une **incompatibilité nucléo-cytoplasmique**. Les gènes impliqués sont alors souvent des protéines intervenant dans le fonctionnement normal de la mitochondrie, comme par exemple la sous-unité 1 du complexe IV (COX1) de la chaîne respiratoire chez le blé (Ikeda et Tsunewaki 1996) ou la sous-unité 6 de l'ATP synthase (ATP6) chez le riz (Iwabuchi *et al.* 1993). Ces sous-unités absentes ou non fonctionnelles dans les tissus de la gamétogenèse mâle provoquent un dysfonctionnement mitochondrial et l'avortement de la production de pollen.

Du fait de la diversité des mécanismes et des gènes impliqués dans l'expression de la CMS et de la restauration, seuls deux traits communs semblent se dégager des études menées sur le sujet :

- (i) L'action des facteurs stérilisants est limitée aux tissus de la gamétogenèse mâle et par conséquent n'altère pas le développement de la plante. Aucune autre altération du développement que la CMS ne leur est associée.
- (ii) Le profil d'expression de ces facteurs (transcrit et/ou protéine) est modifié par la présence des gènes de restauration systématiquement au niveau du développement de la fleur et parfois aussi dans d'autres tissus.

II - LA MITOCHONDRIE VÉGÉTALE

1-Le génome mitochondrial

La taille du génome mitochondrial chez les plantes varie de 180 kb à 2400 kb (Ward *et al.* 1981) selon les espèces contre seulement 16 kb chez l'homme, par exemple. Mais cette différence n'est pas due à une variation du nombre de gènes codés par la mitochondrie puisqu'il reste relativement proche comparé à la grande différence de taille entre génomes de différents organismes (Tableau 2).

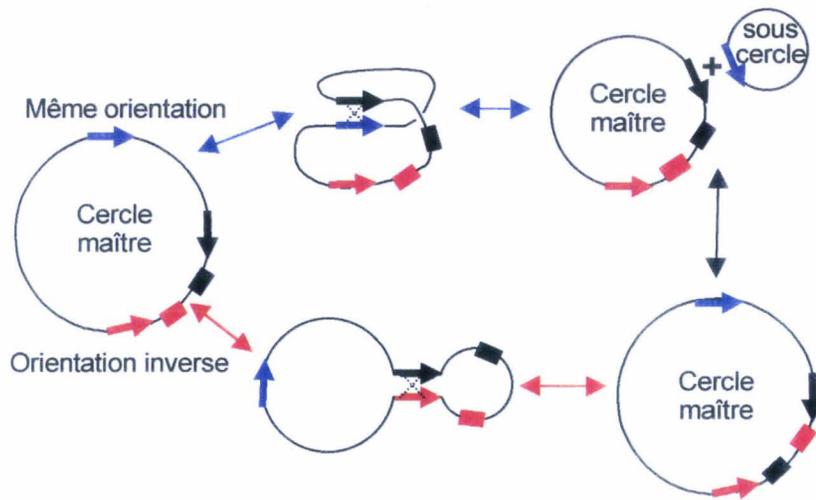


Figure 7 : Schéma des recombinaisons du génome mitochondrial par l'intermédiaire des séquences répétées en orientation directe ou inverse.

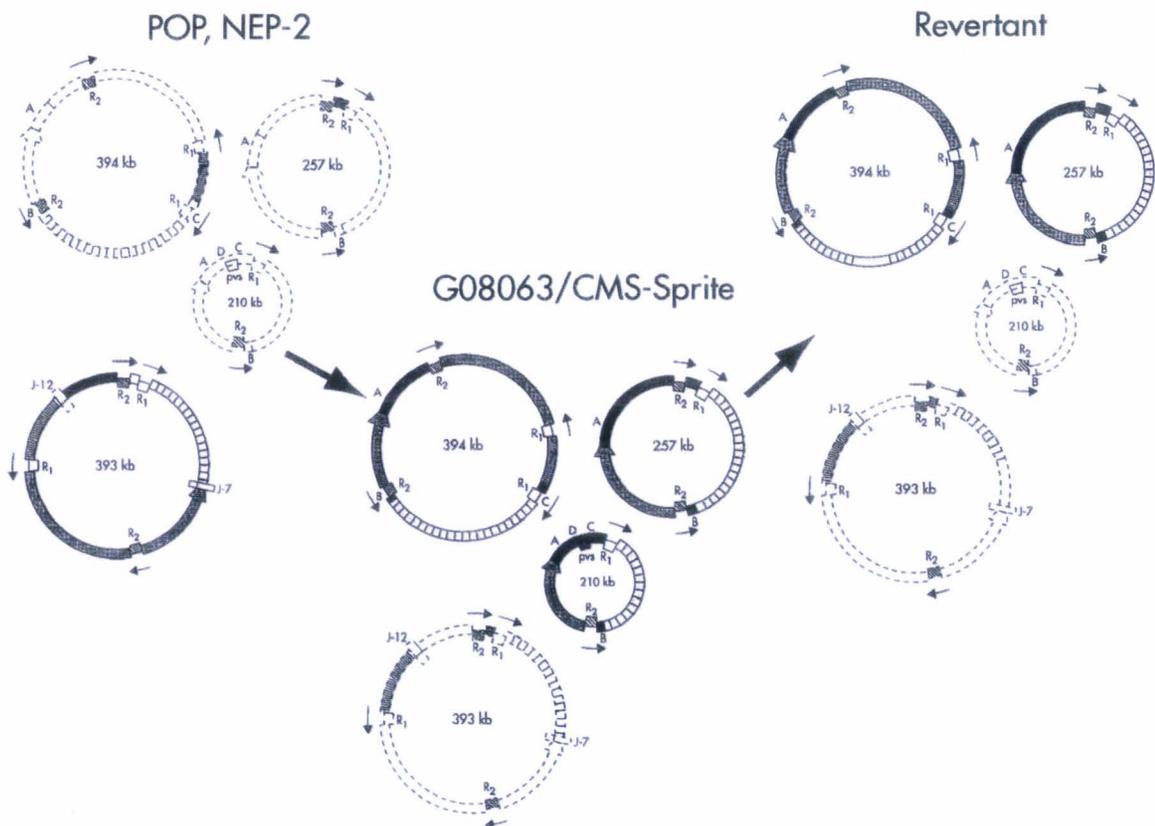


Figure 8 : Modèle des réarrangements mitochondriaux permettant le passage entre les différents types mitochondriaux chez le haricot (POP NEP-2, lignée de départ; G08063/CMS-Sprite, lignée stérile; WPR-3 83-1, lignée révertante). Les sous-cercles génomiques prédominants sont en traits pleins, les sous-cercles sous-stœchiométriques sont en pointillés. R1 et R2 sont les séquences répétées. D'après Janska *et al.* (1998).

	<i>A. thaliana</i> ¹	<i>B. vulgaris</i> ²	<i>M. polymorpha</i> ³	<i>H. sapiens</i> ⁴
Complexe I	9	9	8	7
Complexe II	0	0	2	0
Complexe III	1	1	1	1
Complexe IV	3	3	3	3
Complexe V	4	4	4	2
Protéines ribosomales	7	6	13	0
ARNs ribosomiaux	3	3	3	2
ARNs de transferts	18	18	23	22
Autres	12	14	9	0
Nombre total de gènes	57	58	66	37
Taille du génome (pb)	366 924	368 799	186 608	16 569

Tableau 2 : Composition génique et tailles des génomes mitochondriaux de différents organismes. ¹(Unsold *et al.* 1997) ²(Kubo *et al.* 2000) ³(Oda *et al.* 1992) ⁴(Crews *et al.* 1979).

Les différences de tailles observées dans le génome mitochondrial des plantes sont dues à la présence de nombreuses séquences redondantes, répétées, souvent non-codantes, mais aussi d'ADN exogènes d'origines chloroplastique, nucléaire, voire non identifiés qui représentent plus de 90% du génome chez *A.thaliana*, par exemple.

Les séquences répétées sont à l'origine des réarrangements inter- et intra-génomiques qui peuvent se traduire par une délétion ou une inversion de grands fragments du génome mitochondrial selon leur orientation (Figure 7). Du fait de leur haute activité recombinatoire, elles sont en grande partie responsables de la diversité des types mitochondriaux rencontrés au sein d'une espèce. En plus du cercle maître, le génome mitochondrial comprend aussi une population de sous-cercles génomique, maintenue dans la mitochondrie en sous-stœchiométrie (Small *et al.* 1987). Ces sous-cercles recombinent entre eux par les séquences répétées qu'ils contiennent et peuvent aussi réintégrer le cercle maître et retrouver une stœchiométrie normale (Bellaoui *et al.* 1998, Small *et al.* 1989). Par ailleurs, Janska *et al.* (1998) propose un modèle expliquant le passage entre trois types mitochondriaux (fertile, stérile et révertant) chez *Phaseolus vulgaris* (Figure 8), en faisant seulement intervenir la répartition stœchiométrique de la population des (sous-) cercles génomiques. Enfin, He *et al.* (1995) montrent que les réarrangements et les proportions relatives de ces sous-cercles sont dépendants du contexte nucléaire.

Parallèlement à ces grandes séquences répétées, l'ADN mitochondrial renferme aussi des séquences répétées de plus petites tailles (d'une dizaine à quelques 100^{aies} de paires de bases) (Hartmann *et al.* 1994), moins active en recombinaison, mais qui sont présumées

être à l'origine de recombinaisons entre gènes et à la formation des *orfs* chimériques (Vedel *et al.* 1994).

Le génome mitochondrial des plantes possède donc une organisation complexe de part sa grande taille, sa plasticité et la présence des sous-cercles génomiques. Il contient aussi de nombreuses *orfs* parfois impliquées dans la CMS mais souvent de fonction indéterminée. Enfin, bien que les séquences d'origines de répliquions n'aient pas encore été définies, les observations en microscopie électronique d'ADN mitochondrial végétale (*Chenopodium album*) tendent à montrer qu'il se réplique par *rolling-circle* (Backert *et al.* 1996).

2-Expression du génome mitochondrial

L'expression du génome mitochondrial est essentiellement sous le contrôle de facteurs nucléaires. En effet, aucun facteur de transcription ni d'ARN polymérase ne sont codés par la mitochondrie. Seules quelques protéines, relative à l'expression génomique, (RPL et RPS) et ARNs ribosomiaux (*rrn*), ainsi qu'une partie des ARNs de transfert (ARNt) sont codés par la mitochondrie. Le reste des facteurs est codé par le noyau et importé dans la mitochondrie. Les profils de transcription pour un gène mitochondrial donné ont la particularité d'être souvent complexes, composés de plusieurs transcrits de tailles différentes. Ceci s'explique par la présence de plusieurs sites d'initiation et de terminaison de transcription pour un seul gène (Lupold *et al.* 1999) ainsi que l'existence de maturations post-transcriptionnelle, par clivage (Hanic-Joyce et Gray 1990). La nature des profils de transcription varie en fonction du génome nucléaire associé.

Les ARNs mitochondriaux sont édités, ce qui se traduit par la désamination d'une cytosine en uridine (Blanc *et al.* 1995). La réaction inverse (U en C) a été très rarement décrite. L'analyse complète des transcrits mitochondriaux d'*A. thaliana* (Giege et Brennicke 1999) a révélé 456 sites d'édition C en U (aucun U en C) dont seulement 15 localisés hors séquences codantes. La plupart de ces substitutions induisent des changements d'acides aminés (425 sur 441) qui tendent globalement à augmenter l'hydrophobicité des protéines mitochondriales. Le nombre de site d'édition est extrêmement variable d'un gène à l'autre puisqu'il peut aller de zéro à 62.9 sites par kilobase (par exemple pour *coxI* et l'*orf* 2 de la biogenèse du cytochrome *c* (*ccb2*), respectivement). Par ailleurs, l'édition peut aussi être à l'origine de la formation du codon

ATG de départ (Kadowaki *et al.* 1995) ou du codon STOP (Hernould *et al.* 1992) des phases de lecture. Enfin, Grosskopf et Mulligan (1996) ont montré que la population de transcrits pour un gène donné était composée de transcrits complètement et partiellement édités. La proportion de transcrits partiellement édités dépend du gène, du tissu et du stade de développement de la plante. Ces auteurs suggèrent que l'édition peut aussi être un facteur de régulation post-transcriptionnel.

Les ARNs mitochondriaux peuvent aussi être maturés par des événements d'épissage en *cis* ou en *trans*. Le premier correspond à l'élimination de séquences non-codantes séparant des séquences codantes (exon) sur un transcrit. Le deuxième consiste à assembler plusieurs transcrits (précurseurs) de façon à reformer l'*orf* entière d'un gène (Wissinger *et al.* 1992).

Si tous les ARNs matures (édités et non-édités) peuvent être engagés dans les processus de traduction, les protéines synthétisées issues d'ARN partiellement ou non édités, ne sont pas fonctionnelles et/ou sont rapidement dégradées. Grohann *et al.* (1994) montrent que les séquences peptidiques (N-terminale et internes) obtenues à partir des protéines NAD9 purifiées par immunoprécipitation proviennent uniquement de transcrits édités alors que seulement 50% du pool de transcrits *nad9* sont édités. De même chez le pétunia, des anticorps dirigés contre une séquence peptidique déduite de la séquence non-éditée du transcrit *atp6* ne donnent aucun signal en Western-blot alors que la quantité de transcrits *atp6* partiellement édité est 2.5 fois supérieure à celui des transcrits édités (Lu et Hanson 1994). Par opposition, Phreaner *et al.* (1996) montrent avec un anticorps spécifique de "RPS12 non-éditée" que la protéine est synthétisée et accumulée. Cependant, elle ne serait apparemment pas fonctionnelle puisqu'elle n'est pas assemblée dans les ribosomes. Enfin, rappelons le cas de la CMS du sorgho où l'édition des transcrits du gène *atp6* peut être tissu spécifique et varie de façon qualitative et quantitative en fonction du contexte nucléaire (voir § 2-2).

3-Le métabolisme mitochondrial

3-1-Aspects de la biochimie de la mitochondrie

Le génome mitochondrial code pour une petite partie des protéines impliquées dans sa propre expression, la biogenèse et les fonctions métaboliques mitochondriales. La

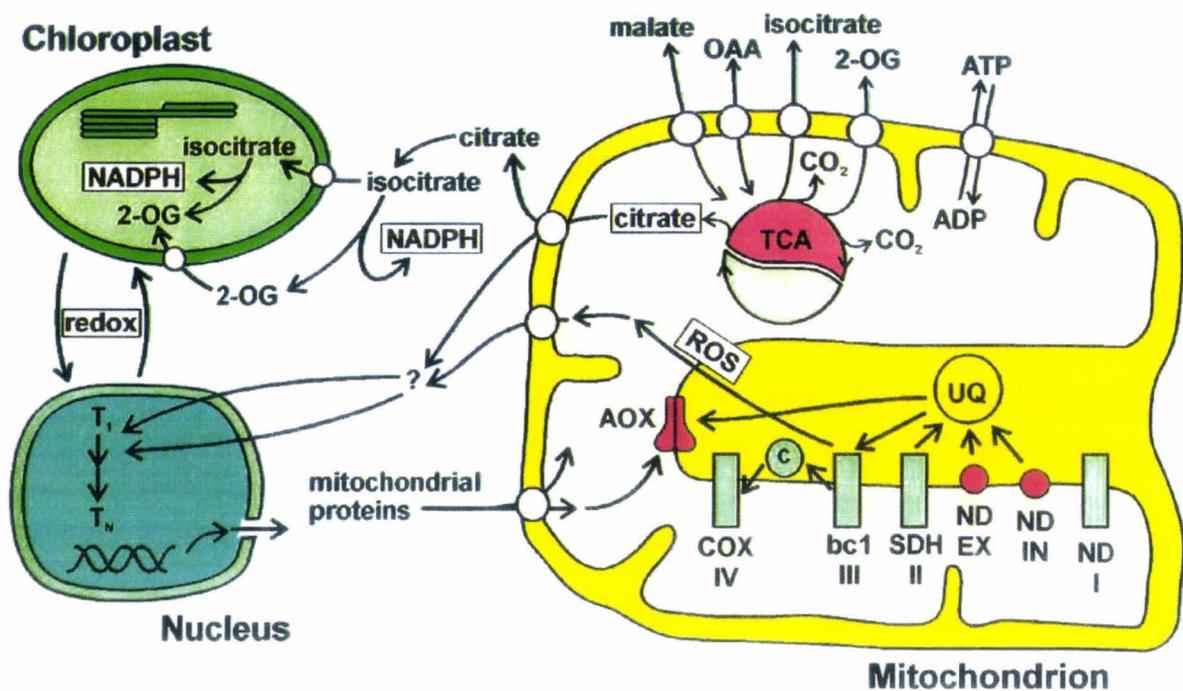


Figure 9 : Schéma général du métabolisme mitochondrial et des interactions entre les organelles et le noyau (d'après Mackenzie et McIntosh 1999).

- ND IN : NADH déshydrogénase interne
- ND EX : NADH déshydrogénase externe
- ND I : Complexe I, NADH :ubiquinone oxydoréductase
- SDH II : Complexe II, succinate déshydrogénase
- bc1 III : Complexe III, cytochrome *bc1*
- COX IV : Complexe IV, cytochrome *c* oxydase
- AOX : oxydase alterne
- UQ : ubiquinone
- c : cytochrome *c*
- TCA : cycle des acides tricarboxyliques, cycle de Krebs
- ROS : espèces oxygénées réactives
- OAA : oxaloacétate
- 2-OG : 2-oxoglutarate

plupart des protéines présentes dans la mitochondrie sont codées par le noyau et importées dans la mitochondrie grâce à un peptide d'adressage mitochondrial souvent situé dans la partie N-terminale. La coordination entre la mitochondrie et le noyau est donc primordiale pour assurer le bon fonctionnement cellulaire et de l'organisme en général (Figure 9).

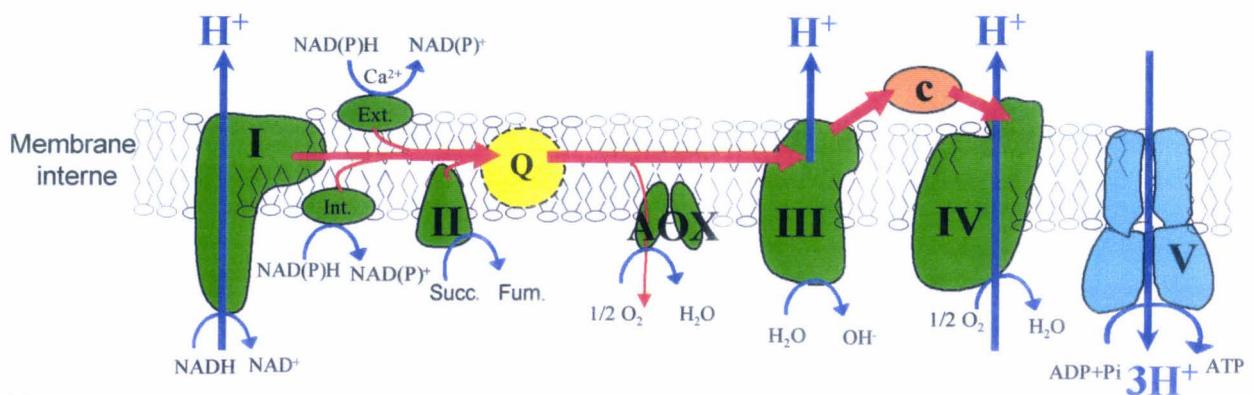
Si la première fonction attribuée à la mitochondrie est la production d'énergie *via* le cycle de Krebs et surtout la phosphorylation oxydative, la première étape de ces deux voies métaboliques, **la glycolyse**, est située dans le cytoplasme en dehors de la mitochondrie. Elle s'accompagne de la production de deux molécules de pyruvate, de **NADH** et d'**ATP** pour chaque molécule de glucose dégradée. Le pyruvate peut-être transformé en acétaldéhyde puis en alcool par la voie de la fermentation alcoolique ou bien peut pénétrer dans la mitochondrie où il est oxydé en acétyl-coenzyme A, première molécule entrant dans le **cycle de Krebs** (ou cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de l'acide citrique). Au bilan, le cycle de Krebs libère du **CO₂**, produit 2 molécules d'**ATP**, 6 molécules de **NADH** et deux molécules de **FADH₂**. La réaction permettant la formation de **FADH₂** est directement liée aux transferts d'électrons vers le pool d'ubiquinones associé à la chaîne respiratoire, puisque la réduction du FAD couplée à l'oxydation du succinate sont deux fonctions attribuées au complexe II de la chaîne respiratoire. Enfin, le **NADH** produit entre dans la chaîne respiratoire par les **NADH déshydrogénases** (voir § 4-2).

Le cycle de Krebs fournit donc des substrats pour les complexes de la chaîne respiratoire (succinate et **NADH**), et ses intermédiaires, qui entrent ou sortent de la mitochondrie par simple diffusion ou grâce à des transporteurs spécifiques membranaires, sont des substrats utilisés dans l'ensemble du métabolisme cellulaire comme par exemple la gluconéogenèse (oxaloacétate (**OAA**), **malate**), la biosynthèse des acides aminés (**2-oxoglutarate (2-OG)**, **isocitrate**) et des acides gras. Si le cycle de Krebs est situé à un carrefour métabolique impliquant l'ensemble du métabolisme mitochondrial dans le métabolisme cellulaire, la production massive d'**ATP** donc d'énergie, est attribuée à la chaîne respiratoire par la phosphorylation oxydative.

3-2-La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire est composée de 4 complexes auxquels vient s'ajouter l'**ATP synthase**, appelée aussi complexe V, ancrés dans la membrane interne de la mitochondrie.

Espace intermembranaire



Matrice

Figure 10 : Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale (adapté de Siedow et Umbach 1995). Les flèches rouges représentent les transferts de d'électrons. Les flèches bleues représentent les transferts de protons. **Ext.** et **Int.**, NAD(P)H externes et internes; **AOX**, oxydase alterne; **Q**, pool d'ubiquinones; **c**, cytochrome *c*.

Mis à part le complexe II, tous les complexes sont constitués de sous-unités codées par le noyau et la mitochondrie (Tableau 3).

Nombre de sous-unités	Complexe I	Complexe II	Complexe III	Complexe IV	Complexe V
Nucléaires	>21	4	9	7	>9
Mitochondriales (<i>nom</i>)	9 (<i>nad</i>)	0 (<i>sdh</i>)	1 (<i>cob</i>)	3 (<i>cox</i>)	4 (<i>atp</i>)
Totales	>30	4	10	10	>13

Tableau 3 : Nombre de sous-unités par complexe et leur origine chez *A. thaliana*

La **phosphorylation oxydative** se traduit par un transfert d'électrons du complexe I vers le complexe IV, issus de l'oxydation de différentes molécules. Ce transfert d'électrons s'accompagne de **consommation d'oxygène** moléculaire et de **production d'ATP** par le complexe V qui utilise le gradient électrochimique de proton généré par la translocation de ceux-ci par les complexes I, III et IV de la matrice vers l'espace intermembranaire (Figure 10).

Le **complexe I** (NADH:ubiquinone oxydoréductase) est le plus grand des complexes avec une masse moléculaire comprise entre 900 et 1000 kDa. Il catalyse l'oxydation du NADH formé dans la matrice mitochondriale par le cycle de Krebs en NAD^+ . Cette réaction s'accompagne d'un transfert d'électrons vers l'ubiquinone et de protons dans l'espace intermembranaire. L'**ubiquinone (Q)** est une molécule lipo-soluble circulant dans la membrane interne mitochondriale.

Le **complexe II** (succinate:ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase, **SDH**) est un des composants du cycle de Krebs qui couple l'oxydation du succinate en fumarate avec la réduction du FAD en FADH_2 et le transfert d'électrons vers l'ubiquinone. Le complexe II ne transfère pas de proton vers l'espace intermembranaire.

Le **complexe III** (ubiquinone cytochrome *c* oxydoréductase, ou cytochrome *bc1*) transfère les électrons du pool d'ubiquinone vers le cytochrome *c*. Cette réaction s'accompagne de la translocation de protons vers l'espace intermembranaire et de la production d' OH^- et d'espèces oxygénées réactives (**ROS**, pour *Reactive Oxygen Species*). Le **cytochrome *c* (*c*)** est une petite protéine soluble de 12,5 kDa localisée dans l'espace intermembranaire. Par ailleurs, le complexe III possède aussi une activité protéasique impliquée dans les mécanismes d'import mitochondrial (Braun *et al.* 1992).

Le **complexe IV** (cytochrome *c* oxydase) est l'accepteur final du transfert d'électrons. L'oxydation du cytochrome *c* s'accompagne du transfert de protons vers l'espace intermembranaire et de la réduction d' O_2 en H_2O .

Le complexe V (F₀F₁-ATP synthase) ne participe pas au transfert d'électron mais utilise le gradient électrochimique généré par la translocation de protons par les complexes I, III et IV pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Il est composé d'un corps multimérique membranaire (F₀) associé à une tête multimérique localisée dans la matrice.

Par opposition aux mammifères, la chaîne respiratoire chez les plantes (mais aussi champignons, levures) comporte deux particularités :

- (i) La présence de **NAD(P)H déshydrogénases additionnelles** situées de part et d'autre de la membrane interne et de ce fait appelées **déshydrogénases internes ou externes**, l'activité de ces dernières peut être calcium dépendante (**Ca²⁺**) (Douce *et al.* 1973).
- (ii) La présence d'une oxydase alterne (**AOX**) permettant le transfert des d'électrons à partir du pool d'ubiquinones directement vers de l'O₂ de la matrice qui est alors réduit en H₂O. L'activation de cette voie dépend de nombreux facteurs environnementaux (froid, blessure, milieu pauvre en phosphate...) et semble aussi régulée de façon post-traductionnelle par un effecteur allostérique (pyruvate) et par son degré d'oxydation.

Ces deux voies alternes ne participent pas au transfert de protons vers l'espace intermembranaire et par conséquent à la production d'ATP par la voie de la phosphorylation oxydative.

4-Exemples de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire

4-1-Les mutants mitochondriaux

L'étude détaillée des fonctions des protéines codées par le génome mitochondrial est difficilement accessible puisqu'il n'existe pas encore de moyen technique permettant de transformer génétiquement les mitochondries végétales. Toutefois, quelques cas de mutants mitochondriaux ont été décrits chez la plante.

Chez le tabac (*Nicotiana glauca*), les **CMSI** et **CMSII** ont été obtenues à partir de plantes régénérées issues de cultures de protoplastes (Chetrit *et al.* 1992, Li *et al.* 1988).

L'analyse du génome mitochondrial a révélé que des réarrangements avaient abouti dans les deux cas à des délétions contenant une partie ou l'ensemble du gène *nad7* (Chetrit *et al.* 1992, Pla *et al.* 1995). L'absence des sous-unités NAD7, NAD9 et d'une protéine de 38 kDa codée par le noyau appartenant au complexe I a été corrélée à une déficience grave de l'activité de ce complexe. Par ailleurs, les voies alternes (NAD(P)H déshydrogénases internes et externes, et oxydase alterne) semblent plus sollicitées chez ces mutants qui, en plus de la stérilité mâle (totale ou partielle selon la photopériode), ont une croissance fortement ralentie (Gutierrez *et al.* 1997).

Chez le maïs, les mutants **NCS (non chromosomal stripe)** sont apparus spontanément dans les lignées de maïs cultivés. Ils possèdent un phénotype particulier puisque leurs feuilles présentent des rayures jaunes et vertes, et s'accompagne souvent de déficiences des fonctions reproductrices. Les délétions affectant différents gènes mitochondriaux sont souvent extrêmement délétères pour la plante qui ne peut survivre qu'en associant des mitochondries normales aux mutées (**hétéroplasmie**).

Les mutants NCS2 présentent une délétion du gène *nad4* (Marienfeld et Newton 1994). Alors que la plupart des mutants NCS ne survivent qu'au travers l'hétéroplasmie, des lignées quasi-homoplasmes de NCS2 ont été obtenues. Elles possèdent un complexe I partiellement assemblé qui conserve une activité NADH déshydrogénase réduite (Karpova et Newton 1999). Les plantes présentent de graves anomalies développementales, ont des feuilles vert pâle et sont femelle et mâle stériles.

Les mutants NCS3 et NCS4 ont des délétions dans les gènes codant pour des protéines ribosomales (RPS3 et RPL16) (Newton *et al.* 1996). Ils présentent aussi de graves anomalies du développement. Les plantes poussent lentement, sont déformées, restent petites, et les feuilles et les tiges sont nécrosées.

Les mutants NCS5 et NCS6 ont une délétion partielle du gène *cox2* résultant dans l'absence de la protéine dans les mitochondries mutées (Lauer *et al.* 1990). Les plantes ne survivent qu'en hétéroplasmie où le taux global de transcrits *cox2* est réduit de moitié (Newton *et al.* 1990). Cette mutation semble aussi avoir un impact sur le fonctionnement du chloroplaste et altère sévèrement le développement et les capacités reproductrices de la plante (Gu *et al.* 1993).

Chez le blé (*Triticum aestivum*), des lignées alloplasmiques obtenues par croisement intergénérique avec *Aegilops columnaris* portant le cytoplasme recombinant U², présentent une stérilité mâle partielle ainsi qu'une réduction de croissance associées à

une déficience de la cytochrome *c* oxydase de la chaîne respiratoire (Ikeda *et al.* 1994). L'analyse du génome mitochondrial a révélé des réarrangements autour des gènes *cox1* et *cox3*. Aucun transcrite correspondant au gène *cox1* n'a été détecté et la quantité de la sous-unité COX2 est réduite de 70% impliquant probablement une réduction de la quantité du complexe IV et les altérations phénotypiques observées (Ikeda et Tsunewaki 1996).

4-2-Les mutants transgéniques et nucléaires

Dans l'optique d'étudier l'importance de l'édition dans la mitochondrie, Hernould *et al.* (1993) ont transformé les noyaux de protoplastes de tabac avec la séquence du gène *atp9* de blé éditée ou non-éditée (Hernould *et al.* 1992), fusionnée avec la pré-séquence d'adressage mitochondrial du gène *cox4* de levure. Les plantes transgéniques obtenues ne présentaient pas d'anomalie du développement mais les lignées possédant la version non-éditée d'*atp9* étaient totalement ou partiellement mâle-stériles. Les auteurs suggèrent que la protéine issue du transgène non-édité interfère avec la protéine ATP9 native. Ceci engendrerait un dysfonctionnement de l'ATP synthase mitochondriale et donc une baisse de la production d'ATP. Seul les tissus de la gamétogenèse mâle nécessitant le plus d'énergie seraient affectés. La fertilité est restaurée en introduisant dans les plantes exprimant déjà *atp9* non-édité, l'ARN anti-sens réduisant considérablement le niveau des transcrits *atp9* non-édité (Zabaleta *et al.* 1996).

Heiser *et al.* (1997) ont introduit dans des plants de pomme de terre un anti-sens visant à réprimer l'expression du gène nucléaire codant pour la sous-unité de 55 kDa du complexe I de la chaîne respiratoire. Dans les plantes transgéniques, le taux de transcrite pour cette protéine de 55 kDa chute de 50% et la quantité de protéine de 33%. Les plantes conservent un développement et une croissance normales mais la production de pollen viable est réduite de 90% dans certains des transgènes analysés. Ici aussi une déficience énergétique dans les tissus reproducteurs serait à l'origine de la stérilité mâle.

Récemment Brangeon *et al.* (2000) ont décrit des mutants nucléaires de *Nicotiana sylvestris* (NMS1, pour *Nuclear Male Sterility 1*) affectant l'épissage du premier intron des transcrits *nad4* de la sous-unité 4 du complexe I. L'analyse en électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines mitochondriales a révélé que l'expression de plusieurs

protéines (codées par la mitochondrie ou le noyau) était affectée. Par ailleurs, les plantes présentent aussi des anomalies dans le développement et la production de pollen.

III – BILAN ET DISCUSSION

L'analyse des CMS utilisées en agriculture a permis dans beaucoup de cas de mettre en évidence des séquences du génome mitochondrial codant pour un polypeptide potentiellement impliqué dans l'expression de la stérilité mâle. En particulier dans le cas du maïs (*T-urf13*) et du haricot (*orf239*), l'étude moléculaire a permis de proposer des hypothèses quant à l'origine génétique de ces séquences et les mécanismes de la stérilité mâle. Dans ces deux cas, les mécanismes conduisant à la CMS semblent extrêmement différents (voir § 2-1 et § 3-1).

Les mécanismes de la restauration et l'identification des gènes impliqués représentent une approche privilégiée pour l'étude des interactions noyau/mitochondrie mais aussi des mécanismes physiologiques de la gamétogenèse mâle. Ici aussi des mécanismes différents apparaissent propres à chaque système de restauration. Par exemple, chez le maïs les gènes de restauration réduisent l'expression du facteur stérilisant dans la plante mais semblent aussi "**adapter**" le métabolisme biochimique de l'anthere lié à la production d'intermédiaire de la fermentation, à la présence de la porine T-URF13. Par contre, chez le haricot la restauration par le gène *Fr* élimine de façon irréversible le fragment d'ADN mitochondrial contenant *orf239* stérilisante. De façon moins drastique chez le colza, l'action du gène de restauration *Rfo* réduit l'accumulation de l'ORF138 dans les anthères (en dégradant la protéine ORF138), **rétablissant** ainsi le fonctionnement normal de l'anthere et la fertilité mâle (Bellaoui *et al.* 1999). La restauration semble donc adapter le métabolisme de l'anthere à la présence des facteurs stérilisants ou bien réduit, voire élimine, ces facteurs de façon à rétablir un métabolisme normal.

Par opposition à la CMS, les dysfonctionnements mitochondriaux décrits chez des mutants de la chaîne respiratoire se révèlent très souvent extrêmement délétères (§ 5). De ce fait, ils disparaîtraient certainement sous la pression de la sélection naturelle et ne sont maintenus qu'en laboratoire. Que ce soit au travers de la mitochondrie ou du noyau, les mutations affectant les gènes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale se traduisent sur la plante, quand elle survit, par de sévères anomalies du développement et

des déficiences du système de reproduction. Par ailleurs, plusieurs indications sembleraient relier le développement floral à une forte activité mitochondriale. Par exemple chez le maïs, Lee et Warmke (1979) dénombrent en microscopie électronique 20 à 40 fois plus de mitochondries dans les cellules du tapis et les cellules sporogènes que dans les autres organes. Chez le tournesol (Smart *et al.* 1994) et le pétunia (Conley et Hanson 1994) le taux de certains transcrits et de certaines protéines appartenant à des complexes de la chaîne respiratoire augmente considérablement dans les tissus de l'anthere suggérant ici aussi que la demande en énergie pendant la gamétogenèse mâle soit plus grande que dans les tissus végétatifs. Enfin, rappelons, que dans le cas des plants de pomme de terre transgéniques, où le complexe I n'est que partiellement déficient (voir §5-2, (Heiser *et al.* 1997)), seule la formation du pollen est affectée. Ceci suggère que les premiers tissus affectés par une baisse de la production d'énergie par la chaîne respiratoire soient ceux de l'anthere.

IV -GÉNÉRALITÉ SUR LA BETTERAVE ET VARIABILITÉ CYTOPLASMIQUE

1-Introduction sur la betterave (*Beta vulgaris*)

Les betteraves forment un genre assez diversifié au sein des *Chenopodiaceae*. Quatre sections bien différenciées ont été distinguées dans le genre *Beta*: sections *Beta*, *Corollinae*, *Nanae* et *Procumbentes*. Une révision récente amène à la distinction de trois espèces dans la section *Beta* : *Beta vulgaris*, *Beta patula* et *Beta macrocarpa* (Letschert 1993). **Les betteraves cultivées appartiennent toutes à l'espèce *Beta vulgaris*.** Elles y sont désignées sous le nom de *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*. Les diverses formes sauvages sont rassemblées au sein de *Beta vulgaris* ssp. *maritima* et *Beta vulgaris* ssp. *adanensis*. **Toutes les formes de *Beta vulgaris*, cultivées ou sauvages sont totalement interfertiles.**

Beta vulgaris est une espèce nitrophile dont les populations naturelles sont rencontrées sur l'ensemble du pourtour méditerranéen, en Turquie et au Moyen-Orient jusque vers le continent indien. Vers le Nord et l'Ouest, l'espèce est présente le long des côtes de l'Europe Occidentale jusqu'au Danemark et le Sud de la Suède ainsi que sur le pourtour des Iles Britanniques. Dans la partie Nord-Ouest de son aire de répartition, *Beta*

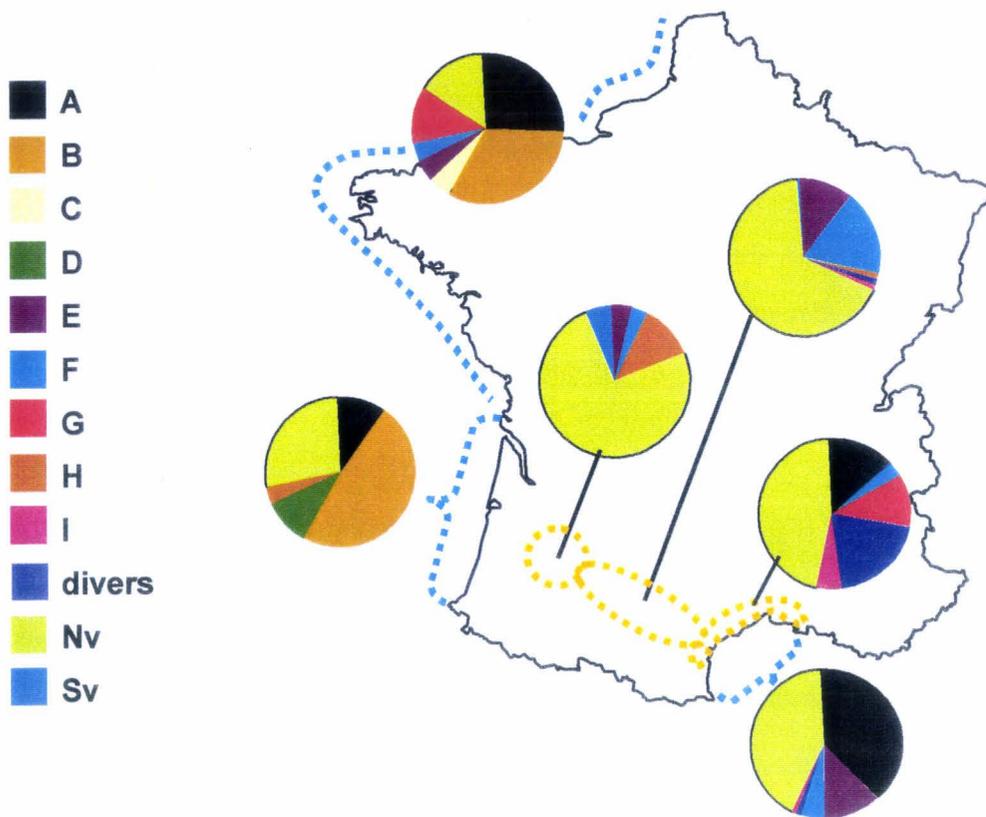


Figure 11 : Localisation et fréquence de 12 groupes de mitotypes de *Beta vulgaris* en France (d'après Cuguen *et al.* 1994).

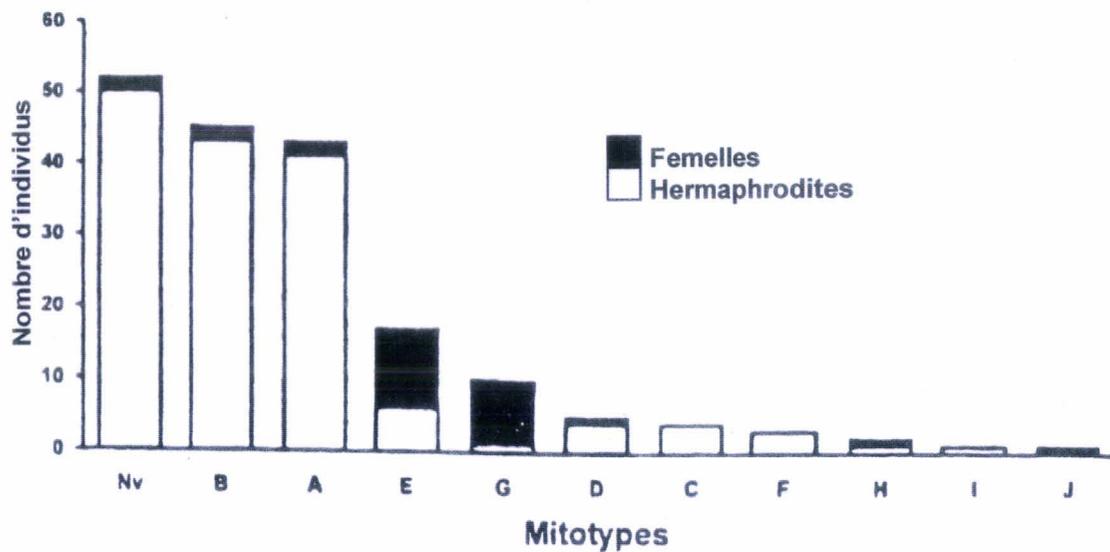


Figure 12 : Association entre phénotypes sexuels et types mitochondriaux (d'après Cuguen *et al.* 1994).

vulgaris ssp. *maritima* justifie pleinement sa dénomination maritime car elle est rencontrée dans une étroite bande côtière.

Les espèces classées dans la section *Beta* présentent un système de reproduction hermaphrodite, autogame, sauf *Beta vulgaris* ssp *maritima* qui est allogame et **auto-incompatible**. C'est une espèce gynodioïque, c'est à dire que des individus hermaphrodites et femelles (mâle-stériles) peuvent coexister au sein d'une même population. C'est une espèce **anémophile**.

2-Variabilité mitochondriale au sein de *Beta vulgaris*

La variabilité mitotypique de *Beta vulgaris* en population naturelle étudiée aux travers de profils RFLP ou de profils de restriction d'ADN mitochondrial a été décrite par différents auteurs (Halldén *et al.* 1988, Jassem 1985, Mann *et al.* 1989, Saumitou-Laprade *et al.* 1991). Le laboratoire GEPV a établi une classification de groupes mitochondriaux basée sur les profils RFLP obtenus avec différentes sondes mitochondriales. Parmi une dizaine de sondes testées (*atpA*, *cob*, *cox1-3*, *atp6*, *atp9*, *pBv3*, *pBv4*, et *ToN2*), les trois sondes révélant le plus de polymorphisme entre les profils d'hybridations ont été retenues:

atp6 (ATP synthase sous-unité 6) : correspond au fragment d'ADN mitochondrial contenant le gène *atp6* isolé chez le maïs (Dewey *et al.* 1985).

pBv4 (plasmide *Beta vulgaris* n°4) : est un fragment d'ADN issu d'une banque génomique d'ADN mitochondrial du type CMS *Owen* (Saumitou-Laprade *et al.* 1993b).

ToN2 (Type "O" n°2) : est le fragment de restriction *EcoR1* de l'ADN mitochondrial du type *Nv* de 12.5 kb isolé en gel d'agarose (Cuguen *et al.* 1994).

Les profils RFLP combinés de ces trois sondes ont permis, à ce jour, de distinguer 23 groupes de mitotypes dans les différentes populations de betteraves sauvages du littoral français et de la péninsule ibérique (Desplanque *et al.* 2000).

La fréquence des différents groupes de mitotypes déterminée dans les populations françaises est extrêmement variable d'une population de betteraves sauvages à l'autre (Figure 11). Sur l'ensemble des populations les types *Nv* (28%), *A* (23%) et *B* (25%) sont ceux rencontrés en plus haute fréquence.

Parmi les différents groupes analysés chez les betteraves sauvages, quatre ceux sont révélés fortement associés au phénotype mâle-stérile (Figure 12): *E*, *G*, *H* et *Sv* (Cuguen *et al.* 1994).

Le type *Sv* (ou *Owen*) rencontré à un niveau cryptique en population naturelle est le principal type mitochondrial utilisé dans les programmes de sélection de betteraves sucrières dans le monde.

Les mitotypes associés à la stérilité mâle les plus fréquents rencontrés en populations naturelles sont les types *E*, puis le type *G*. L'origine cytoplasmique de ces stérilités mâles a été confirmée par croisements réciproques sur les types *E* ou *G* avec des lignées de betteraves sucrières fertiles (type *Nv*). Ces deux cytoplasmes sont aujourd'hui exploités dans les programmes de sélection de betteraves cultivées.

Le type *H* est rencontré de façon cryptique mais est aussi fortement associé au phénotype mâle stérile et de ce fait il aussi potentiellement un cytoplasme stérilisant (Laporte *et al.* 1998).

Remarque : Récemment, le séquençage complet du génome de la betterave sucrière fertile (Kubo *et al.* 2000) a permis de "replacer physiquement" sur sa représentation graphique les sondes utilisées dans la détermination des groupes mitochondriaux (Annexe I).

3-Les différentes CMS dans la betterave sucrière

3-1-La CMS Owen de la betterave sucrière

Le cytoplasme *Owen* décrit pour la première fois par F.V. Owen en 1945 (Owen 1945) est la principale source de CMS utilisée en création variétale. Les nombreuses études moléculaires menées ces 15 dernières années montrent une grande différence entre le génome mitochondrial de la CMS *Owen* et leurs mainteneurs associés. En effet, les profils de restriction d'ADN mitochondrial et les profils obtenus en Southern-blot entre ces deux cytoplasmes sont extrêmement différents. La comparaison des cartographies complètes du génome mitochondrial de la CMS *Owen* (Kubo *et al.* 1999) et d'un mitotype fertile (Kubo *et al.* 1995a) a confirmé qu'un grand nombre de réarrangements intra-génomiques sépare ces deux mitotypes. Cette divergence rend difficile l'identification d'un fragment de

restriction spécifique de la CMS *Owen* et son implication dans l'expression de la stérilité mâle.

Le même problème se pose avec les ARN messagers mitochondriaux pour lesquels les profils d'expression de la plupart des gènes analysés sont différents entre les deux cytoplasmes : *cox1*, *cox2*, *cox3*, *atpA*, *atp6*, *nad1-a* (Dudareva *et al.* 1991, Saumitou-Laprade *et al.* 1993a, Xue *et al.* 1994). Toutefois, Kubo *et al.* (1999) décrivent un effet des gènes de restauration sur les profils d'expression du gène *cox1* décelé uniquement dans les fleurs de betterave. En effet, les profils obtenus en Northern-blot avec une sonde *cox1* entre deux plantes fertiles et CMS *Owen* sont différents, mais le profil obtenu avec une plante restaurée sur *Owen* est identique à celui de la plante fertile. Les auteurs décrivent des substitutions nucléotidiques dans la partie 5' non codant de *cox1* et montrent que le transcrit est modifié en 5' dans les boutons floraux des plantes stériles *Owen*.

Mais il faut souligner que la betterave sucrière est cultivée pour sa racine et non pas pour ses graines. Les lignées CMS/mainteneur entretenues dans les programmes de sélection ont des fonds nucléaires proches. Par contre, les lignées restaurées introduites dans les différentes études sont souvent basées sur des fonds nucléaires différents. Par conséquent, il est difficile de faire la part dans les variations observées dans les profils d'expression des plantes restaurées entre un effet du fond nucléaire et un effet réel des gènes de restauration.

La comparaison des profils d'expression protéique obtenus en synthèse *in organello* entre les deux cytoplasmes n'a pas permis de mettre en évidence de variation strictement associée au cytoplasme *Owen*. L'absence de deux polypeptides de 21 et 32 kDa décrite par Boutry *et al.* (1984) dans la CMS *Owen* ne s'est pas révélée systématique dans les profils d'expression obtenus sur ce cytoplasme (Halldén *et al.* 1992, Lind *et al.* 1991). Les profils de synthèse *in organello* décrits par Lind *et al.* (1991) montrent des variations quantitatives de certains produits de synthèse dans les différents organes de la plante (racines, feuilles, fleurs) mais ne trouvent aucune variation strictement associée au cytoplasme *Owen*.

Nous avons comparé les profils d'expression mitochondriale du cytoplasme *Owen* et de son mainteneur en synthèse *in organello* avec des mitochondries de feuilles. Nous avons utilisé 3 couples de lignées de betteraves basées sur des fonds nucléaires différents de façon à pouvoir différencier un effet du fond nucléaire et une réelle spécificité cytoplasmique. Afin d'augmenter la résolution de la séparation des produits de synthèse

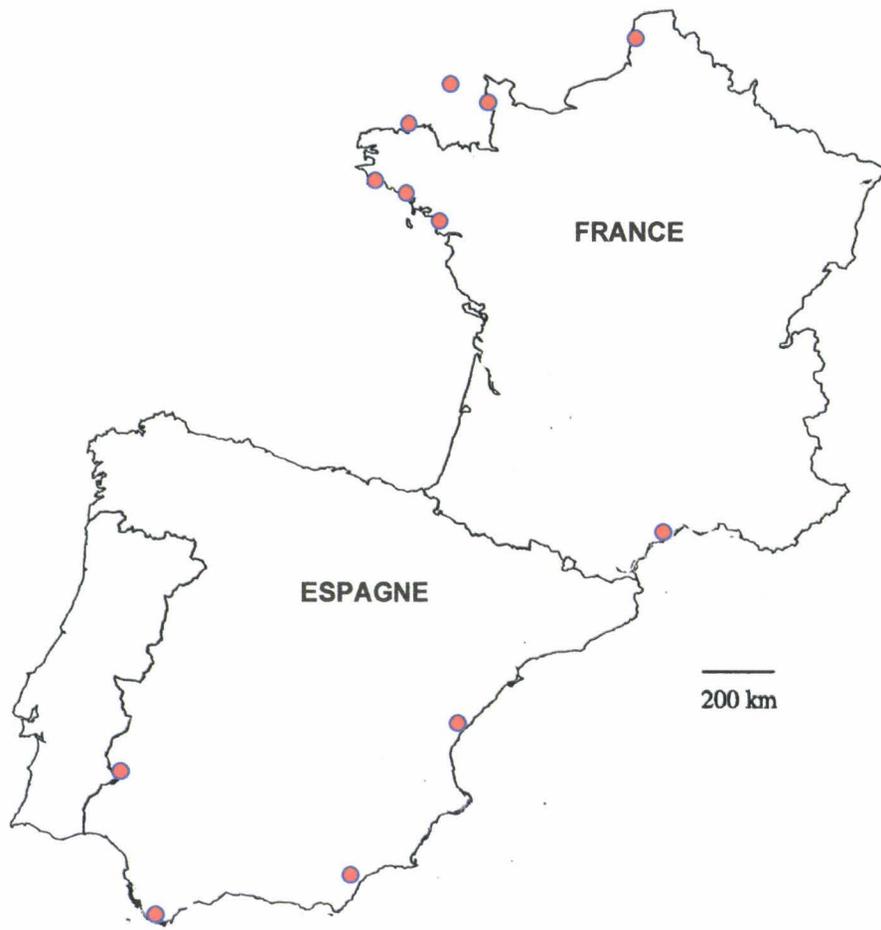


Figure 13 : Répartition des différentes populations de betteraves maritimes analysées dans lesquelles le cytoplasme *G* a été rencontré (d'après Desplanque *et al.* 2000). Les cercles pleins rouges indiquent la présence de la CMS *G*.

mitochondriale, ils ont été séparés en électrophorèse acide/base. Cette technique offre une meilleure séparation des protéines hydrophobes et nous a permis de distinguer une cinquantaine de produits de synthèse au lieu des 25-30 habituellement obtenus en électrophorèse à une dimension. La comparaison des profils d'expression protéique des cytoplasmes *Owen* et de son mainteneur ont révélé des variations indécélables en électrophorèse à une dimension. Toutefois aucune d'entre elles n'a pu être spécifiquement associée à la CMS *Owen* et ont plutôt été corrélées à un effet du contexte nucléocytoplasmique sur l'expression du génome mitochondrial en synthèse *in organello* (ce travail réalisé dans le cadre de cette thèse fût l'objet de l'article joint en annexe II).

A ce jour, aucune *orf* ni polypeptide mitochondrial n'a pu être spécifiquement attribué à la CMS *Owen* et les mécanismes moléculaires responsables de la stérilité mâle dans ce cytoplasme restent inconnus.

3-2-Le cytoplasme *G*, nouvelle source de CMS et état des lieux

Différentes sources de CMS ont pu être obtenues par mutagenèse par irradiation aux rayons γ (Kinoshita 1976) mais la principale source de CMS pour les betteraves sucrières reste les populations naturelles de betteraves maritimes (Boutin *et al.* 1987, Halldén *et al.* 1988, Jassem 1985, Mann *et al.* 1989, Sadoch et Goc 1997, Saumitou-Laprade *et al.* 1993b).

Les CMS *E* et *G* ont été introduites en betteraves cultivées comme sources alternatives de stérilité à la CMS *Owen*. Mis à part les données écologiques obtenues de part leur origine naturelle, les mécanismes moléculaires de ces CMS ont à ce jour été peu étudiés.

Le cytoplasme *G* a une aire de répartition géographique vaste et on le rencontre dans la plupart des populations des betteraves maritimes en France et sur la péninsule ibérique (Figure 13). La fréquence de la CMS *G* rencontrées dans les populations naturelles peut varier de 0 à 15% (Cuguen *et al.* 1994). L'étendue géographique de sa distribution suggère que l'apparition de cette CMS en population naturelle ne soit pas un phénomène récent.

L'introduction de la CMS *G* dans les programmes de sélection de betteraves sucrières nous a permis de travailler sur des lignées cultivées avec des fonds nucléaires

proches, constituant des paires quasi-isogéniques et possédant les cytoplasmes G (stérile) ou Nv (fertile).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les mécanismes moléculaires de la stérilité mâle cytoplasmique ont à ce jour surtout été étudiés sur des espèces végétales cultivées et les facteurs de sélection de ces cytoplasmes stérilisant sont évidemment liés à un intérêt agronomique. On peut alors se demander si de telles plantes, altérées dans leur fonction mâle, peuvent se maintenir en milieu naturel ? En réalité, la CMS a été décrite dans de nombreuses espèces végétales en population naturelle comme le thym, la carotte, le plantain ou la betterave. Alors que les résultats obtenus en génétique des populations semblent confirmer les modèles mathématiques qui prédisent que le maintien de la CMS en milieu naturel nécessite un avantage sélectif, peu d'études ont été menées au niveau moléculaire sur l'identification des facteurs stérilisant d'une CMS d'origine naturelle.

Les études menées ces 10 dernières années au laboratoire GEPV sur les populations naturelles de betteraves maritimes ont permis de mettre en évidence une grande diversité mitotypique au sein de cette espèce. Dans les populations naturelles de betteraves hermaphrodites, la présence d'individus mâle-stériles a permis, parmi les 23 groupes de mitotypes recensés, d'identifier trois sources de CMS : *E*, *G* et *H*. Les CMS *E* et *G* sont aujourd'hui utilisées comme nouvelles sources de stérilité pour la betterave sucrière.

A ce jour le déterminisme moléculaire de l'expression de la stérilité mâle cytoplasmique chez ces betteraves sauvages n'a pas été identifié. La diversité mitotypique entre les plantes fertile et stérile rend extrêmement complexe la comparaison au niveau génomique et transcriptionnel.

L'objectif de cette thèse est de déterminer les caractéristiques moléculaires du cytoplasme stérilisant *G* issus des populations naturelles de betteraves sauvages au travers de l'étude de son expression protéique mitochondriale.

Nous avons dans un premier temps caractérisé le phénotype floral de la CMS *G* (Chapitre II, partie I).

Nous avons ensuite mis en évidence la présence des polypeptides mitochondriaux spécifiques de la CMS *G*. Ces polypeptides ont été identifiés et caractérisés (Chapitre II, partie II).

Enfin, nous avons étudié l'impact des modifications protéiques observées sur le fonctionnement de la mitochondrie dans le cytoplasme stérilisant *G* (Chapitre II, partie III).

CHAPITRE I

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

I - MATERIEL VEGETAL

1-Betteraves cultivées (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)

Les différentes lignées de betteraves sucrières utilisées dans cette étude ont été fournies par l'INRA de Dijon. Les caractéristiques des CMS et de leurs mainteneurs associés (*Nv*) sont décrits dans le Tableau ci-dessous :

Lignée	Cytoplasme associé	Fond nucléaire	Nombre de back-cross	Phénotype
Q525	<i>Nv</i>	564	8	Fertile
Qo525	<i>CMS G</i>¹	564	7	Stérile
Po89	<i>CMS Owen</i>	564	7	Stérile
Q518	<i>Nv</i>	126	11	Fertile
Qo518	<i>CMS G</i>¹	126	10	Stérile
Qo515	<i>CMS Owen</i>	126	11	Stérile
P435	<i>Nv</i>	2558	5	Fertile
Po435	<i>CMS G</i>²	2558	5	Stérile
Q535	<i>Nv</i>	2766	6	Fertile
Qo535	<i>CMS G</i>¹	2766	6	Stérile
N11	<i>Nv</i>	93	7	Fertile
No11	<i>CMS Owen</i>	93	7	Stérile
Po8	<i>CMS E</i>	93	6	Stérile
Q1	<i>Nv</i>	148	9	Fertile
Qo1	<i>CMS Owen</i>	148	9	Stérile
Qo2	<i>CMS E</i>	148	7	Stérile

Description des lignées de betteraves sucrières utilisées (localisation géographique de l'origine de la CMS *G* : ¹ St Nazaire, ² île de Batz).

Les coupes histologiques de boutons floraux ont été réalisées par Anne-Marie Faber sur des betteraves sucrières fertile (*Nv*) ou stérile (*G*) de la lignée Q535. Le principe de la méthode est d'abord de fixer les tissus dans du paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0.1% (pH 7.2), puis de les déshydrater par des bains successifs d'éthanol en augmentant progressivement de 30% à 100% le degré de l'alcool. Enfin, les tissus sont enrobés dans la

résine qui, après polymérisation, est découpée au microtome (1 ou 2 μm). Les coupes sont colorées au bleu de toluidine et observées au microscope optique en immersion.

Dans toute cette étude, lorsque le fond nucléaire n'est pas précisé, il s'agit de la lignée Q535 (*CMS G, Nv*), qui a été principalement utilisée dans les différentes expériences.

2-Betteraves sauvages (*Beta vulgaris ssp. maritima*)

Les betteraves sauvages utilisées dans cette étude sont issues de la descendance maternelle d'une betterave maritime mâle-stérile sur le cytoplasme *G*, récoltées en population naturelle dans la région de Bages (Aude) en 1995 et caractérisées pour leur type mitochondrial et leur phénotype floral (mâles-stérile et fertilité mâle restaurée). Le cytoplasme *G* a été dans un premier temps caractérisé par la technique RFLP (*atp6*, *pBv4*, *ToN2*) utilisée au laboratoire GEPV puis, par les marqueurs moléculaires plus spécifiques décrits dans cette thèse (*nad9*, *cox2*).

Les colorations de grains de pollen au vert d'Alexander ont été réalisées par Marianne de Paepe. Les plantes analysées proviennent d'une descendance issue du croisement contrôlé d'une plante femelle sur *G* avec une plante hermaphrodite restaurée sur *G*. Les deux plantes du croisement proviennent de la même descendance maternelle prélevée *in situ en* 1995 sur une plante femelle sur *G* d'une population de betteraves maritimes de Bages (Aude).

II – METHODES D'ANALYSES PROTEIQUES

1-Préparation des mitochondries

La méthode utilisée pour la purification des mitochondries et les synthèses *in organello* est celle décrite par Boutry *et al.* (1982).

1-1-Solutions

Solution de stérilisation :

NaCl : 1% (p/v)
Hypochlorite de calcium : 1% (p/v)
Tween 20 : 0.1% (p/v)
Conserver la solution à 4°C

Milieu d'homogénéisation :

Sucrose : 0.4 M
Tris : 1 mM
EGTA : 5 mM
pH 8.0 (HCl)

Aliquoter en 10 fois 100 ml, autoclaver (doux) et stocker à 4°C (plusieurs mois)

Ajouter avant l'utilisation (pour 100 ml):

BSA (sans acide gras) : 1% (p/v)
Polyvinipyrimidol (soluble) : 0.1% (p/v)
β-mercaptoéthanol : 40 µl

Milieu de suspension :

Mannitol : 0.4 M
KH₂PO₄ : 10 mM
pH 7.2 (KOH)

Aliquoter en 10 fois 50 ml, autoclaver (doux) et stocker à 4°C (plusieurs mois)

Ajouter avant l'utilisation BSA : 0.5% (p/v)

Gradients de Percoll (gradients de 4.5 ml)

Les trois solutions de concentration de Percoll sont préparées comme indiqué ci-dessous. Les différentes couches de Percoll sont coulées avec une pipette pasteur dans des tubes TST60 (Beckman) dans l'ordre : 21%, 45% et 13.5%. Les gradients sont conservés verticalement dans la glace jusqu'à leur utilisation.

Composition des gradients de Percoll:

[Percoll]	Percoll 100%	Saccharose 1 M	H ₂ O stérile	BSA
45%	2.25 ml	1.25 ml	1.5 ml	0.025 g
21%	2.1 ml	2.5 ml	5.4 ml	0.05 g
13.5%	1.35 ml	2.5 ml	6.15 ml	0.05 g

1-2-Méthode

Tout le matériel utilisé pour la préparation des mitochondries est stérile et conservé à 4°C.

2-3 g de jeunes feuilles de betteraves sont incubées 3 minutes dans 250 ml de milieu de stérilisation à 4°C sous agitation. Les feuilles sont ensuite rincées à l'eau milli-Q, essorées et placées dans du papier absorbant dans la glace.

Les feuilles sont broyées dans 20 ml de milieu d'homogénéisation par 3 impulsions de 1, 4 et 3 secondes dans un broyeur électrique. L'homogénat est filtré sur 4 couches de miracloth et centrifugé 30 secondes à 6000 rpm dans un rotor JA-17 (Beckman). Le surnageant est transvasé dans des tubes propres et centrifugé 12 minutes à 14000 rpm (JA-17).

Le culot est alors repris délicatement dans 1 ml de milieu de suspension et placé sur un gradient discontinu de Percoll pour une ultracentrifugation de 30 minutes à 20000 rpm. Les mitochondries sont récupérées à l'interface 21%/45% du gradient de Percoll, diluées dans 1.5 ml de milieu de suspension pour éliminer l'excès de Percoll et centrifugées 10 minutes à 14000 rpm (centrifugeuse Eppendorf). Le culot de mitochondries est finalement repris dans 20 µl de milieu de suspension.

A ce stade, les mitochondries sont immédiatement utilisées pour les synthèses *in organello* et les tests d'activités enzymatiques ou éventuellement stockées à -20°C pour les analyses protéiques en gels par électrophorèse.

2-Synthèse *in organello*

2-1-Solutions

Milieu de synthèse :

KH₂PO₄ : 5 mM

GTP : 2 mM

Mannitol : 0.4 M

KCl : 60 mM

Dithiothréitol : 2 mM

Hepes : 50mM

MgCl₂ : 10 mM

Malate : 10 mM

Pyruvate : 1 mM

ADP (sel de K⁺) : 4 mM

Mélange d'acides aminés à 25 µM chacun (alanine, asparagine, valine, glutamine, leucine, aspartate, isoleucine, glutamate, proline, lysine, phénylalanine, arginine, tryptophane, histidine, glycine, sérine, thréonine, cystéine, tyrosine)

pH 7.0 (KOH)

Filtrer sur millipore 0.22 µm, aliquoter en 10 fois 1 ml et stocker à -80°C (1 mois).

Avant l'utilisation ajouter (pour un 1 ml) :
BSA (sans acide gras) : 0.1% (p/v)
Erythromycine : 0.4% (p/v) (dissout dans l'ethanol)
L-[³⁵S]-méthionine (*redivue*, Amersham): 1 µl (15 µCi)

Milieu d'arrêt :

Sucrose : 0.4 M
L-méthionine : 12 mM
KH₂PO₄ : 10 mM
pH 7.0 (KOH)
Aliquoter en 20 fois 5 ml et stoker à -20°C (plusieurs mois).

2-2-Méthode

Les mitochondries fraîchement préparées sont incubées 1 heure à 25°C dans 110 µl de milieu de synthèse sur plaques agitantes (150-200 rpm) afin de maintenir une bonne oxygénation du milieu pendant la synthèse. Le marquage des protéines *in organello* est interrompu par ajout de 500 µl de milieu d'arrêt contenant un excès de méthionine non marquée. Deux aliquots de 20 µl sont prélevés pour le comptage de radioactivité incorporée.

Les synthèses sont centrifugées 10 min à 14000 rpm. Les culots sont repris dans 20 µl de tampon de suspension puis stockés à -20°C.

2-3-Expérience de "pulse-chase"

Un échantillon de mitochondries fraîches est réparti entre deux synthèses.

Le "pulse" est obtenu à partir de la première synthèse *in organello* arrêtée après 7 minutes de marquage. Cette brève synthèse permet de conserver intacte une partie des précurseurs marqués pendant la synthèse.

La "chasse" est obtenue avec la deuxième synthèse en ajoutant, 7 minutes après le début du marquage, 10 µl de milieu de synthèse modifié avec 250 mM de L-méthionine froide (concentration finale 25 mM). L'incubation est poursuivie 40 minutes puis arrêtée avec le milieu d'arrêt.

Les protéines marquées pendant les 7 premières minutes de synthèse sont maturées pendant les 40 minutes de "chasse". La méthionine froide, 1000 fois plus concentrée que la

³⁵S-méthionine, réduit considérablement la synthèse de protéines marquées tout en permettant la maturation des précurseurs.

2-4-Comptage de la radioactivité incorporée

Les aliquots de 20 µl prélevés après les synthèses sont déposés sur des rectangles de papier Whatman 3MM de 1 x 1.5 cm préalablement saturés avec 50 µl de TCA (20% p/v)/méthionine (50 mM). Les papiers séchés sont portés à ébullition dans une solution de 5% de TCA. Ils sont placés 3 minutes dans du TCA (5%) et lavés 2 fois 3 minutes dans une solution éthanol:éther (1:1), puis 2 fois 3 minutes dans de l'éther pur. Ils sont ensuite séchés et placés dans des tubes à scintillation avec 3 ml de mélange scintillant Luma Safe (Lumac LSC). Les échantillons sont alors analysés par un compteur à scintillation (LS1701 Analyser, Beckman).

3-Dosage de la quantité de protéine

Afin de réduire la contamination par la BSA présente dans tous les milieux de préparation des mitochondries, les culots mitochondriaux sont resuspendus dans 1.5 ml de milieux de suspension sans BSA et centrifugés 10 minutes à 14000 rpm. L'opération est effectuée 3-4 fois.

La quantité de protéines est déterminée par la méthode de dosage de Bradford (1976) réalisée dans un volume de 1 ml. Les échantillons sont lus en microplaque de titration (350 µl par puits) par un lecteur de microplaques à 595 nm. Une gamme étalon de BSA de 1 à 7 µg de protéine est réalisée.

4-Electrophorèses en gels de polyacrylamide

4-1-Gel dénaturant en présence de SDS (SDS-PAGE)

4-1-1-Composition du gel

Le gel est composé de deux parties. La partie supérieure est le gel de concentration à 4% d'acrylamide. La partie inférieure est le gel de migration constitué d'un gel à 15% d'acrylamide ou d'un gradient continue de 12%-17% d'acrylamide.

Solution d'acrylamide (100 ml):

Acrylamide (30% p/v) : 30 g

Bis-acrylamide (0.8% p/v) : 0.8 g

La solution est désionisée une nuit à 4°C à l'obscurité en présence de résine échangeuse d'ions (AG 501-X8D, BioRad)

L'acrylamide est filtré sur miracloth et stocké à l'obscurité à 4°C (plusieurs mois)

Tampon pour le gel de concentration 4x :

EDTA : 8 mM

Tris : 0.5 M

SDS : 0.4% (p/v)

pH 6.8 (HCl)

Tampon pour le gel de migration 4x :

EDTA : 8 mM

Tris 1.5 M

SDS : 0.4% (p/v)

pH 8.8 (HCl)

Composition des gels d'acrylamides :

[gel]	Acryl./bis. 30%/0.8%	Tampon de migration x 4	Tampon de concentration x 4	H ₂ O	APS 10%	Temed
15%	18 ml	9 ml	-	8.8 ml	200 µl	18 µl
12%	7.2 ml	4.5 ml	-	6.2 ml	100 µl	9 µl
17%	10.2 ml	4.5 ml	-	3.2 ml	100 µl	9 µl
Concentration	1.2 ml	-	2 ml	4.7 ml	100 µl	9 µl

Les gels de migration sont coulés verticalement dans un système de cuve à électrophorèse Strudier SE400 (Hoefer) avec des intercalaires de 1.5 mm. Le gradient 12%-17% est coulé avec un appareil à gradient relié à une pompe péristatique. Après polymérisation, le gel est surmonté du gel de concentration.

4-1-2-Préparation des échantillons

Tampon de solubilisation 3x:

Tris : 80 mM

SDS : 2% (p/v)

Glycérol : 10% (p/v)

Bleu de bromophénol : 0.005% (p/v)

pH 6.8 (HCl)

Ajouter 1% (p/v) de dithiothréitol avant utilisation.

Les échantillons de protéines sont solubilisés 10 minutes à 37°C dans le tampon de solubilisation (ajusté à 1 fois concentré avec H₂O) puis centrifugés 5 minutes à 14000 rpm. Le surnageant est chargé sur le gel d'électrophorèse.

4-1-3-Conditions d'électrophorèses

L'électrophorèse est conduite à 40 mA pendant environ 5 heures ou à 10 mA pour une migration sur la nuit (environ 16 heures). Les cuves anode et cathode sont remplies avec le même tampon de migration (Tris 50 mM, glycine 0.4 M, EDTA 2.5 mM, SDS 0.2% (p/v), sans titrage du pH).

4-1-4-Conditions de transfert

Le gel est transféré par *electroblotting* sur membrane de nitrocellulose ou PVDF (pour séquençage protéique uniquement) 2 heures à 500 mA immergé dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 0.2 M, méthanol 20%, SDS 0.4%, sans titrage du pH).

Les membranes correspondant aux synthèses *in organello* sont séchées et exposées 2 à 3 semaines sur des films BioMax MR.

4-2-Electrophorèse à deux dimensions base/acide (SDS/TDAB-PAGE)

L'électrophorèse à deux dimensions base/acide est basée sur la méthode décrite par Penin *et al.* (1984). Elle permet une meilleure séparation des protéines hydrophobes que l'électrophorèse à deux dimensions classique (iso-électro-focalisation/SDS-PAGE). En

effet, la présence de détergents, anionique (SDS) ou cationique (TDAB), dans les deux dimensions permet une meilleure solubilisation des protéines et le changement de pH entre les deux gels (pH 8.8 pour SDS et pH 3.0 pour TDAB) se traduit par une variation conséquente de la distance de migration des protéines selon leur nature.

La première dimension consiste en une électrophorèse dénaturante d'un gradient continu d'acrylamide 12-17% en présence de SDS (§ 4-1).

4-2-1-Composition du gel acide

La deuxième dimension consiste en l'électrophorèse d'un gel acide (pH 3.0) en présence de TDAB. Le gel est constitué d'un gradient continu d'acrylamide 10-16% coulé dans un système de cuve Protean II xi Cell (BioRad) avec des intercalaires de 2.5 mm.

Composition du gel migration:

[gel]	Acryl./bis. 30%/0.8%	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ 1.5 M, pH 2.0	acide ascorbique 1%	FeSO ₄ 0.003%	TDAB 0.175 M	H ₂ O ₂ 0.03%
10%	12.6 ml	16.1 ml	1.9 ml	2.9 ml	2.9 ml	0.5 ml	1 ml
16%	20.1 ml	8.6 ml	1.9 ml	2.9 ml	2.9 ml	0.5 ml	1 ml

Composition du gel de concentration à partir des solutions stock (10 ml) :

KH₂PO₄ (0.5 M, pH 4.0) : 2.52 ml

TDAB (0.175 M) : 0.2 ml

H₂O : 7.28 ml

Agarose (0.8% p/v) : 0.08g

4-2-2-Préparation des échantillons

Après la première dimension, des bandes d'environ 5 mm de large sont découpées dans le prolongement des puits où ont été déposés les échantillons. Après 4 incubations de 15 minutes dans du tampon de dénaturation (sucrose 0.25 M, TDAB 35 mM, KH₂PO₄ 100 mM, pH 4.0, β-mercapto-éthanol 1.6% (v/v), vert de malakite 0.001% (p/v)), les bandelettes sont déposées horizontalement au sommet du gel acide puis scellées avec une solution chaude de tampon de dénaturation avec 0.8% d'agarose chaud.

4-2-3-Conditions d'électrophorèse acide

Le gel est placé dans du tampon de migration (glycine 75 mM, TDAB 0.125%, pH 3.0 (H₃PO₄)) pour une migration d'environ 16 heures à 50 V constant.

Dans les conditions d'électrophorèse acide les protéines sont chargées positivement. Elles migrent donc de l'anode vers la cathode. Il faut donc inverser les branchements "plus" et "moins" aux bornes de la source de courant.

4-2-4-Conditions de transfert acide

Le transfert est effectué dans les conditions décrites en 4-1-4 dans du tampon de transfert acide (glycine 85 mM, méthanol 20%, TDAB 0.4%, pH 3.0). Les branchements aux bornes de la source de courant doivent être inversés (§ 4-2-3).

4-3-Gel non-dénaturant (bleu natif PAGE)

Le gel non dénaturant permet de séparer les protéines en conservant l'intégrité des complexes composés de plusieurs sous-unités. Il permet de séparer des complexes dont la taille peut atteindre 1000 kDa. La méthode utilisée pour séparer les complexes mitochondriaux est celle décrite par Jansch *et al.* (1996).

4-3-1-Composition du gel

Le gel de migration est composé d'un gradient continu d'acrylamide 5-12% surmonté d'un gel de concentration. Le gel est coulé avec un appareil à gradient dans un système de cuve d'électrophorèse Studier (Hoefler) avec des intercalaires de 1.5 mm.

Tampon gel natif 3x :

Acide amino-caproïque : 1.5 M
Bis-tris : 150 mM
pH 7.0 (HCl)

Composition du gel :

[gel]	Acryl./bis. 48%/1.5%	Tampon gel natif x 3	Glycérol	H ₂ O	APS 10%	TEMED
5%	1.8 ml	6 ml	-	10.1 ml	80 µl	8 µl
12%	3.6 ml	5 ml	3 g	4.3 ml	50 µl	5 µl
Concentration	0.6 ml	2.5 ml	-	4.33 ml	60 µl	6 µl

4-3-2-Préparation des échantillons

Après une centrifugation de 10 minutes à 14000 rpm, le culot de mitochondries est resuspendu dans 5 volumes de tampon "AcA" (EDTA 50 mM, acide amino-caproïque 750 mM, bis-tris 50 mM, pH 7.0). Les échantillons de protéines sont solubilisés par l'ajout de 1 volume de *n*-dodécylmaltoside (DDM) 10% (1.66% au final) et laissés 30 minutes à 4°C. 1 volume de Serva Blue G 5% est alors ajouté avant une ultra-centrifugation de 30 minutes à 100000 g (Airfuge, 30 psi). Le surnageant contenant la fraction solubilisée des protéines est chargé sur le gel.

4-3-3-Conditions d'électrophorèse

Pour l'électrophorèse en gel natif la composition des tampon de migration de la cuve correspondant à la cathode (haut) est différente de celle correspondant à l'anode (bas). Afin de préserver l'intégrité des complexes protéiques séparés pendant l'électrophorèse, la migration s'effectue à 4°C.

Une première migration d'1 heure à 100 V permet aux protéines d'entrer dans le gel. Le reste de la migration s'effectue à 250 V constant pendant environ 16 heures.

Tampon pour cathode :

Tricine : 50 mM

Bis-tris : 15 mM

Serva blue G : 0.02% (p/v, dissout dans méthanol)

pH 7.0

Le tampon est filtré sur une couche de papier Whatman 3MM et stocké à 4°C.

Tampon pour anode :

Bis-tris : 50 mM

pH 7.0

4-3-4-Conditions de transfert

Avant le transfert du gel sur membrane de nitrocellulose ou PVDF, le gel est incubé 30 minutes dans du tampon de transfert (§ 4-1-4).

4-3-5-Deuxième dimension dénaturante : (bleu natif) SDS-PAGE

La composition des complexes protéiques séparés en électrophorèse non-dénaturante peut être analysée par une deuxième électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE).

Après migration, le gel natif est incubé 3 fois 30 minutes dans le tampon de solubilisation (x 1) utilisé pour les échantillons des gels SDS-PAGE. Des carrés correspondants aux complexes isolés sont ensuite découpés dans l'acrylamide et placés au sommet d'un gel SDS-PAGE 15% ou 12-17%. Ils sont scellés par une solution chaude de tampon de migration (SDS-PAGE) avec 1% d'agarose. Les conditions de migration sont décrites au paragraphe 4-1-3.

5-Coloration des protéines

5-1-Coloration des gels de protéines

5-1-1-Coloration au bleu de Coomassie

Après électrophorèse, le gel est fixé 30 minutes dans une solution d'acide acétique 10% et méthanol 40% puis coloré une heure dans une solution de bleu de Coomassie (Coomassie brillant blue G-250 0.25% (p/v), acide acétique 10% (v/v), méthanol 40% (v/v)). La décoloration est obtenue par plusieurs bains successifs dans la solution d'acide acétique/méthanol 10%/40%.

5-1-2-Coloration au nitrate d'argent

Avant la coloration au nitrate d'argent, le gel est abondamment rincé par plusieurs bains dans l'eau MilliQ.

Le gel est traité 1 minute dans une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 5 H_2O (0.2 g/l) puis rincé 3 fois 20 secondes à l'eau MilliQ. Il est ensuite incubé dans une solution d' AgNO_3 (2 g/l), formaldéhyde (0.750 ml de 37% HCOH/l) pendant 20 minutes et rincé 10 secondes à l'eau MilliQ. Enfin, l'image latente des protéines marquées à l'argent est révélée par une solution de Na_2CO_3 (60 g/l), formaldéhyde (0.500 ml de 37% HCOH/l), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 5 H_2O (0.004 g/l). La coloration est arrêtée par deux bains de 2 minutes à l'eau MilliQ et un bain dans une solution de glycine 5%.

Le gel peut-être décoloré par un bain de 2-3 heures dans une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 g/l) et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 5 H_2O (1.6 g/l), puis abondamment rincé à l'eau MilliQ.

5-2-Coloration des membranes après électro-transfert

5-2-1-Coloration à l'amido-black

Après l'électro-transfert, la membrane est directement immergée 5-10 minutes dans une solution d'amido-black (1 g/l), acide acétique 5%, méthanol 20%. La décoloration est obtenue par plusieurs bain à l'eau MilliQ ou plus rapidement avec une solution d'acide acétique 5%, méthanol 20%.

5-2-2-Coloration au Rouge Ponceau

Après l'électro-transfert, la membrane est directement immergée 5-10 minutes dans une solution de Rouge Ponceau 0.5%, acide acétique 3%, puis décolorée par plusieurs bain à l'eau MilliQ. Cette méthode est utilisée pour les membranes destinées aux immuno-détections.

6-Immunodétection des protéines (Western-blot)

Après transfert, la membrane peut être colorée au Rouge Ponceau (§ 5-2-2) ou bien directement incubée 2 heures dans le tampon de blocage (TBS, Tween 20 0.5% (p/v), lait écrémé 3% (p/v)), puis lavée 3 fois dix minutes dans la solution de rinçage (TBS, Tween

20 0.1%, lait écrémé 0.5%). La membrane est ensuite placée 1 heure en présence du premier anticorps dilué dans la solution de rinçage (voir condition d'utilisation ci-dessous). La solution contenant l'anticorps peut être récupérée et stockée à 4°C pour un usage à court terme. La membrane est rincée 3 fois 10 minutes et placée 1 heure en présence du deuxième anticorps dilué au 1/10000 (anti-lapin ou anti-souris couplé avec la phosphatase alcaline (kit Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), Roche).

Tampon TBS 10x : Tris 24.2 g
NaCl : 80 g
pH 7.6 (HCl)

Conditions d'utilisation des anticorps:

Anticorps	Dilution	Quantité de protéine chargée	Organisme	Type	Origine	Référence
antiCOX2	1/10000	5-10 µg	maïs	polyclonal	lapin	(Kumar <i>et al.</i> 1995)
antiNAD9	1/10000	5-10 µg	blé	polyclonal	lapin	(Lamatina <i>et al.</i> 1993)
antiAOX	1/100	50-100 µg	<i>Sauromatum guttatum</i>	monoclonal	souris	(Elthon <i>et al.</i> 1989b)

7-Mesure des activités enzymatiques

7-1-Obtention de particules submitochondriales

Le culot de mitochondries fraîchement préparées est resuspendu dans 100 µl de NaH₂PO₄ 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2, puis soniqué 3 fois 10 secondes. Le tube est refroidi quelques secondes dans la glace entre chaque sonication.

7-2-Activité NADH:ubiquinone oxydoréductase (Complexe I)

7-2-1-Mesure de l'oxydation du NADH

La méthode utilisée est celle décrite par Leterme (1993), adaptée. Le milieu réactionnel contient du NaH₂PO₄ 50 mM, EDTA 1 mM, *n*-dodécyl-maltoside 0.05% (p/v), duroquinone 100 µM (solution stock 10 mM dans éthanol), NADH 100 µM. La réaction

est amorcée par l'addition de 50 μg de particules sub-mitochondriales. L'oxydation du NADH est mesurée à 340 nm à 25°C ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

L'activité du complexe I est spécifiquement inhibée par l'addition de 60 μM de roténone dans le milieu réactionnel.

7-2-2-Mesure de la réduction du cytochrome *c*

La méthode utilisée est celle décrite par Mannella (1987) adaptée. Le milieu réactionnel contient du NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 1mM, cytochrome *c* 0.1% (p/v), *n*-dodécylmaltoside 0.05% (p/v), KCN 1 mM, NADH 100, pH 7.2. La réaction est amorcée par l'addition de 50 μg de particules sub-mitochondriales. La réduction du cytochrome *c* est mesurée à 550 nm à 25°C.

L'activité du complexe I est spécifiquement inhibée par l'addition de 60 μM de roténone dans le milieu réactionnel.

7-3-Activité cytochrome *c* oxydase (Complexe IV)

La méthode utilisée est celle décrite par Tolbert (1968) adaptée. Le milieu réactionnel contient du NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 1 mM, cytochrome *c* réduit par la dithionite (hydrosulfite de sodium) 0.1% (p/v), *n*-dodécylmaltoside 0.5% (p/v), pH 7.2. La réaction est amorcée par l'addition de 10 μg de particules sub-mitochondriales. L'oxydation du cytochrome *c* est mesurée à 550 nm à 25°C ($\epsilon_{\text{Cyt.c}} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La réaction enzymatique est inhibée par 1 mM de cyanure de potassium (KCN).

III - METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1-Analyses des acides nucléiques : ADN

1-1-Extraction d'ADN total de plante

L'extraction est réalisée d'après la méthode décrite par Dellaporta *et al.* (1983). Les feuilles de betteraves récoltées (1 g) sont immédiatement congelées dans l'azote liquide puis broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le broyat est versé dans 10 ml de tampon d'extraction (Tris 100 mM, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM, PVP 2% (p/v), pH 8.0) et vigoureusement agité avant d'ajouter 10 µl de β-mercapto-éthanol et 1 ml de SDS 20%. Le mélange est incubé 20 minutes à 65°C. Après l'incubation, 2 ml d'acétate de potassium 5 M sont ajoutés. Le mélange est délicatement homogénéisé et placé 15 minutes dans la glace avant d'être centrifugé 20 minutes à 12000 g à 4°C. Le surnageant est filtré au travers deux couches de Miracloth et additionné de 10 ml d'isopropanol. Après homogénéisation, l'ADN est précipité 1 heure à -20°C. L'ADN est culotté par une centrifugation de 5 minutes à 20000 g, le surnageant est éliminé et le culot est séché avant d'être repris dans 5 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). L'ADN est de nouveau précipité par addition d'un volume isopropanol (5 ml) et 1/10 de volume (0.5 ml) de d'acétate de sodium (3.3 M), homogénéisé et placé 1 heure à -20°C. Après une centrifugation de 30 minutes à 20000 g, le surnageant est éliminé, le culot d'ADN est alors séché puis lavé 2 fois à l'éthanol 70% glacé, séché, avant d'être repris dans 0.5 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA, 1 mM, pH 8.0). L'ADN est aliquoté puis stocké à 4°C (à court terme) ou -20°C (long terme).

1-2-Digestion d'ADN

2 µg d'ADN sont digérés sur la nuit avec différentes enzymes de restriction dans le tampon approprié, en présence de spermidine (10 mM) à la température recommandée par le fabricant. Dix unités d'enzyme sont utilisées par microgramme d'ADN.

1-3-Electrophorèse de gel d'ADN

Après digestion, 1/6 de volume de bleu de charge (6x) est additionné. Les échantillons sont directement chargés sur un gel d'agarose 0.8% dans du TAE (1x). La migration s'effectue sur la nuit à 30 V ou en 4 heures à 80 V.

Tampon de charge 6x :

Bleu de bromophénol : 0.25%
Xylène cyanol : 0.25%
Glycérol : 30%
EDTA 10 mM

TAE 10x :

Tris : 400 mM
Acétate de sodium : 200 mM
EDTA : 20 mM
NaCl : 180 mM
pH8.0

1-4-Transfert de gel d'ADN

Les gels d'ADN sont transférés sur une membrane de Nylon (Biodyne A, Poll) sous vide à 50 mbar dans un vacuum-blotter Vacugene XL (Pharmacia Biotech). Avant le transfert, le gel est traité 10 minutes dans la solution de dépurination (HCl 0.25 N), 10 minutes dans la solution de dénaturation (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) et 10 minutes dans la solution de neutralisation (Tris 1 M, NaCl 1.5 M, pH 7.2). Le transfert est effectué dans du SSC 2x (citrate de sodium 0.3 M, NaCl, 3 M, pH 7.0) pendant 1h30.

L'ADN est fixé par une irradiation aux UV (*UV cross-linking*) avec une énergie de 1.2 J/cm², rincée 5 minutes dans SSC 2x et conservé dans du papier Whatman.

1-5-Hybridation (Southern-blot)

1-5-1-Préparation des sondes et marquage froid

Les sondes d'ADN utilisées sont directement synthétisées et marquées par PCR par incorporation de dUTP liés à la digoxigénine (PCR Dig-labelling mix, Boehringer).

Mix PCR :

ADN : 5-10 ng
1^{ère} amorce : 0.4 μ M
2^{ème} amorce: 0.4 μ M
Mix dNTP-dig : 200 μ M
Tampon Taq polymerase : x 1
MgCl₂ : 3.5 mM
Taq polymérase : 1.25 U
H₂O qsp 50 μ l

Conditions pour la PCR :

Cycles	Températures	Temps
1	94°C	2 min
30	92°C	40 sec
	56°C	40 sec
	72°C	1 min
1	72°C	5 min
1	21°C	10 min

Deux PCR de 50 μ l par sonde sont regroupées et purifiées sur colonne (QIAquick, QIAGEN). En fin de purification, l'ADN fixé dans la colonne est élué dans 100 μ l de tampon TE. La sonde est stockée à -20°C.

1-5-2-Conditions d'hybridations

La membrane est placée en tube et incubée dans la solution de préhybridation (SDS 0.02%, laurylsarcosyl 0.1%, SSC 5x, agent bloquant 1%) dans un four d'hybridation à 72°C pendant au moins 4 heures. La solution est ensuite remplacée par la sonde diluée au 1/1000 dans la solution de préhybridation, préalablement dénaturée 10 minutes dans un bain à 100°C. L'hybridation s'effectue au moins une nuit à 72°C.

La membrane est lavée 2 fois 5 min à température ambiante dans du SSC 1x, SDS 0.1%, puis 2 fois 5 min dans SSC 0.1x, SDS 0.1% et enfin 2 fois 15 min dans SSC 0.1x, SDS 0.1% à 56°C.

1-5-3-Révélation

La révélation des sondes froides s'effectue par réaction immunologique avec un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline qui produit une réaction chimioluminescence avec le CSPD (Boehringer) utilisé comme substrat pour la révélation.

Après les étapes d'hybridation, la membrane est rincée 1 minute dans le tampon 1 (Tris 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5). Elle est ensuite saturée par une incubation de 30 minutes en tube à hybridation dans le tampon 2 (Tris 0.1 M, NaCl 0.15 M, agent bloquant 1% pH 7.5) puis incubée 30 minutes avec l'anticorps anti-digoxigénine (Fab fragment, Boehringer) dilué au 1/5000 dans le tampon 2. La membrane est lavée 2 fois 15 minutes dans le tampon 1, rincée 2 minutes dans le tampon 3 (Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50mM, pH 9.5) et incubée en sac 30 minutes à 4°C avec une solution de tampon 3 contenant le CSPD dilué au 1/1000.

La solution de tampon 3/CSPD est éliminée et la membrane est exposée de 30 minutes à 6 heures, voire une nuit sur un film autoradiographique.

La membrane peut être deshybridée par un bain dans une solution bouillante des SDS 0.5%, puis rincée 3 fois 5 minutes dans SSC 2x.

1-6-Séquençage d'ADN

Les séquences d'ADN ont été réalisées par séquençage direct de produits PCR pour les fragments de taille inférieure à 600 pb ou avec une étape intermédiaire de clonage pour les fragments de taille supérieure. Toutes les séquences ont été contrôlées par 3 expériences indépendantes.

1-6-1-Amplification par PCR

Les produits PCR destinés au séquençage sont amplifiés avec la Taq Gold (Perkin Elmer) pour assurer une meilleure fidélité de séquence.

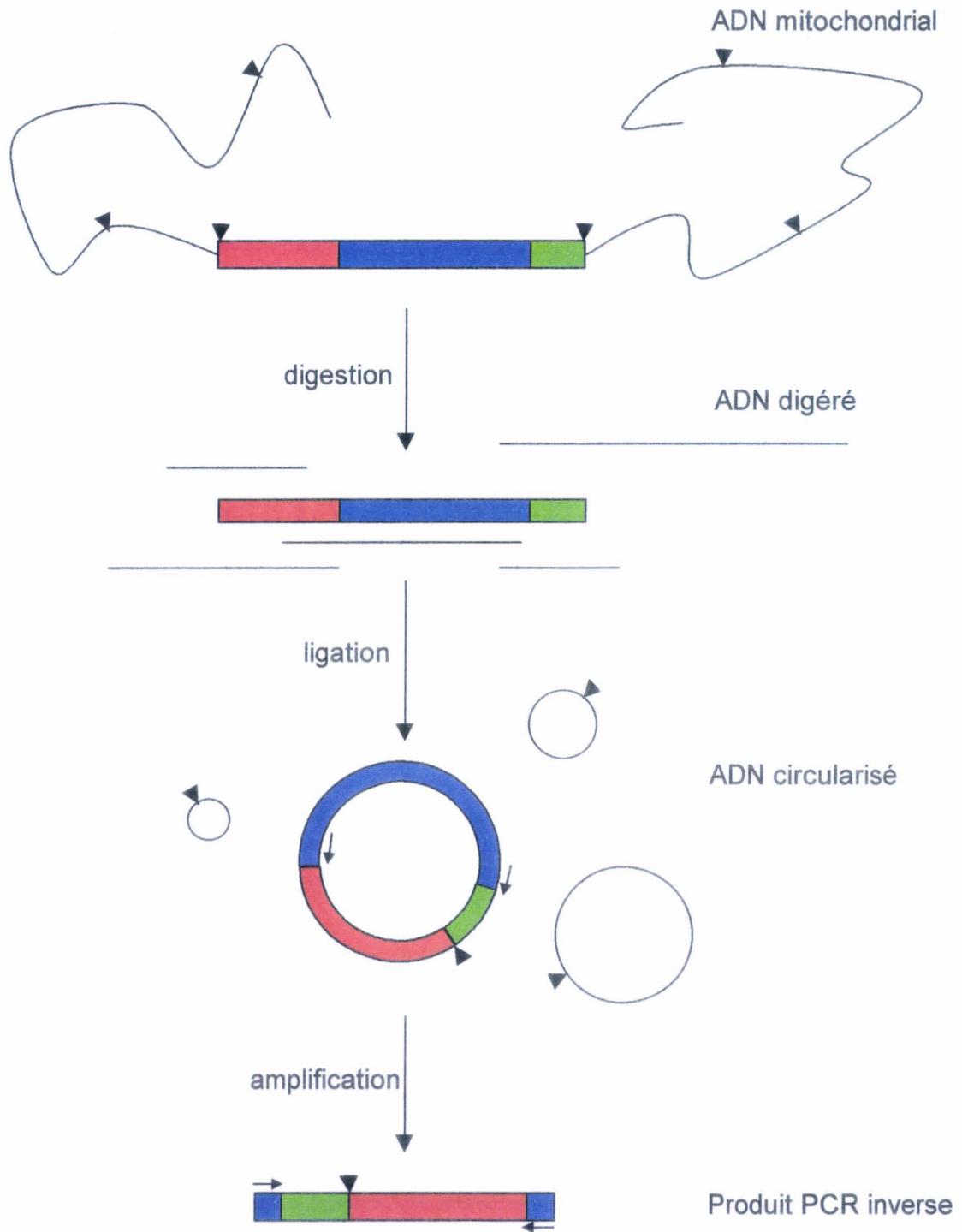


Figure 1 : Principe de la PCR inverse. Le rectangle bleu représente une séquence d'ADN connue, flanquée par deux séquences inconnues (rouge et verte). Les triangles noirs symbolisent les sites de restriction. Les flèches sont des amorces définies dans la séquence d'ADN connue en orientations opposées.

Mix PCR :

ADN : 5-10 ng
 1^{ère} amorce : 0.4 µM
 2^{ème} amorce: 0.4 µM
 Mix dNTP : 200 µM
 Tampon Taq polymérase : x 1
 MgCl₂ : 3.5 mM
 Taq polymérase Gold: 1.25 U
 H₂O qsp 50 µl

Conditions PCR :

Cycles	Températures	Temps	
1	94°C	10 min	(hot start)
35	92°C	40 sec	
	56°C	40 sec	
	72°C	1 min	
1	72°C	5 min	
1	21°C	10 min	

Amorces PCR:

	Amorce 5'	Amorce 3'
<i>cox2-exon1</i>	5'-AGAGAGCGGAGCAGTCAAAG-3'	5'-AATCACCTTCGTGAAGAGGC-3'
<i>cox2-exon2</i>	5'-TTGCAAGTACAGTTTGGGGG-3'	5'-CGGCTTCTCTTCTTCACCCT-3'
<i>cox2-intron</i>	5'-TGGACATCAATGGTATCGGA-3'	5'-AACGTGATTGACCCAATTCTG-3'
<i>Gnad9-1</i>		5'-AGATCCAGGGCCTAAAAACG-3'
<i>Gnad9-2</i>	5'-TTTGAGCAAGAAGCGGAACT-3'	
<i>nad9</i>		5'-AGGATTCCTTTTGTAACCCAAT-3'
<i>iPCR nad9</i>	5'-TTGCAAGTACAGTTTGGGGG-3'	5'-CTTCCATCAATCATCCGGAT-3'

1-6-2-PCR inverse (iPCR)

La PCR inverse est une méthode qui permet d'amplifier par PCR les régions flanquant une séquence d'ADN connue. Le principe est décrit dans la figure 1.

5 µg d'ADN total sont digérés dans un volume final de 300 µl par 50 U d'enzyme de restriction produisant des extrémités cohésives (*Hind*III, *Eco*R1...) pendant une nuit à 37°C. L'ADN est purifié par une extraction phénol/chloroforme et chloroforme puis précipité par 2.5 volumes d'éthanol et 1/10 de volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5.2), 1

heure à -20°C . Après une centrifugation de 10 minutes à 14000 rpm, le culot est lavé 2 fois à l'éthanol 70%, séché et repris dans 50 μl d' H_2O .

L'ADN est ensuite refermé sur lui-même une nuit à 15°C avec 7 U de T4 DNA ligase dans un volume final de 300 μl . La ligase est inactivée 15 minutes à 70°C et l'ADN est de nouveau extrait par phenol/chloroform, chloroform et lavé à l'éthanol. Le culot est repris dans 50 μl d' H_2O .

10 μl de cet ADN circularisé sont utilisés pour la PCR inverse dans un volume final de 50 μl dans les conditions suivantes:

Mix iPCR :

ADN circularisé : 10 μl
1^{ère} amorce : 0.8 μM
2^{ème} amorce: 0.8 μM
Mix dNTP : 280 μM
Tampon Taq polymérase : x 1
 MgCl_2 : 3.5 mM
Taq polymérase Gold: 2 U
 H_2O qsp 50 μl

Conditions iPCR :

Cycles	Températures	Temps	
1	94 $^{\circ}\text{C}$	10 min	(hot start)
40	92 $^{\circ}\text{C}$	40 sec	
	53 $^{\circ}\text{C}$	40 sec	
	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min	
1	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
1	21 $^{\circ}\text{C}$	10 min	

La qualité d'amplification est contrôlée en déposant 10 μl de la PCR sur un minigel d'agarose 1% dans du TBE (Tris 88 mM, acide borique 88 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3). Puis, 0.1 à 5 μl sont utilisés comme matrice d'ADN pour une deuxième PCR dans les conditions standards décrites au § 1-6-1.

1-6-3-Clonage des produits d'amplification PCR

Les clonages de produit PCR sont réalisés avec le kit de clonage pGEM[®]-T Vector System de Promega. Les produits d'amplification PCR possédant une extension adénosine

sur leur extrémité 3' sont insérés dans le vecteur pGEM[®]-T par complémentarité avec l'extension thymidine en 3' du vecteur ouvert. Après ligature et transformation bactérienne, les bactéries transformées sont sélectionnées par le système classique de colonies blanc/bleu (α -complémentation).

Pour le clonage direct des produits PCR, le dernier cycle de PCR (§ 1-6-1) correspondant à l'extension finale est allongée à 30 minutes de manière à augmenter le taux d'adénylation des extrémités 3' des fragments amplifiés. Le produit PCR est alors purifié sur colonne (PCR Purification Kit, Quiagen).

Les ligatures sont réalisées une nuit à 4°C avec 3 fois plus d'insert que de vecteur selon les conditions décrites par le fournisseur. La transformation bactérienne est réalisée avec la souche thermosensible JM109 par un choc thermique de 50 secondes à 42°C. Après une incubation d'1h30 à 37°C dans le milieu SOC, les cellules sont étalées sur boîtes sélectives avec de l'ampicilline, de l'IPTG et du X-Gal.

L'insert des bactéries sélectionnées est contrôlé par PCR sur lyse bactérienne en utilisant les amorces complémentaires des sites SP6 et T7 flanquant l'insert du vecteur.

Milieu SOC (100 ml) :

Bactotryptone : 2 g
Extrait de levure : 0.5 g
NaCl 1 M : 1 ml
KCl 1 M : 0.25 ml
Mg²⁺ 2 M (solution stock MgCl₂,6H₂O (203 g) et MgSO₄, 7 H₂O (247 g)): 1 ml
Glucose 2 M : 1 ml
pH 7

1-6-4-Séquençage automatique d'ADN

Les séquenceurs automatiques LiCor 4000L ou 4200L ont été utilisés pour l'analyse des produits de réaction de séquences.

Pour le séquençage direct des produits PCR les amorces utilisées, spécifiques du gène cible, sont étendues sur leur extrémités 5' par les séquences universelles M13 (directe ou indirecte), et les produits d'amplification purifiés sur colonne QIAquick. Pour les séquences d'ADN clonés, l'ADN plasmidique est isolé avec un système de mini-préparations (High Pure Plasmid Isolation Kit, Boehringer).

Les réactions de séquences sont réalisées selon les instructions d'utilisation du système ABI Prism™ Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit (PE Applied Biosystems) avec les amorces M13, SP6 ou T7 marquées avec un fluorochrome (IRD700 ou IRD800, GenSet).

1-7-Analyse des mutations ponctuelles par PCR-restriction

Certaines mutations ponctuelles rencontrées dans les gènes étudiés font apparaître ou disparaître un site de restriction. On peut donc les mettre en évidence directement en digérant le produit PCR par l'enzyme de restriction appropriée (*EcoR1*, *AseI*, *TaqI*).

Après amplification, un aliquote de 9.8 µl de produit PCR est prélevé et digéré 2 heures à 37°C avec 6 unités d'enzyme de restriction dans le tampon recommandé par le fabricant. Le résultat est visualisé sur un minigel d'agarose 1.5% en présence de bromure d'éthidium.

2-Analyses des acides ribonucléiques : ARN

2-1-Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir des jeunes feuilles betteraves en présence d'acide aurine tricarboxylique selon la méthode décrite par Stern *et al.* (1986).

Trois grammes de jeunes feuilles de betterave sont récoltés et immédiatement broyés dans l'azote liquide. La poudre fine est transférée dans 20 ml de tampon d'extraction (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, SDS 2%, acide aurine tricarboxylique 2 mM, β-mercaptoéthanol 15 mM) à température ambiante et vigoureusement agité. Après addition de 3.1 ml de KCl 3 M à 0°C, le mélange est incubé 15 min sur la glace, puis centrifugé 20 min à 8000 rpm (rotor JA-17, Beckman). Le surnageant est filtré sur 2 couches de Miracloth et transféré dans un nouveau tube contenant 8.9 ml de LiCl 8 M et incubé au moins 6 heures à 4°C.

Le mélange est centrifugé 20 min à 8000 rpm (rotor JS-1301, Beckman) et le culot est resuspendu dans 8.8 ml d'eau. Après addition de 4.4 ml de phénol non équilibré et 1 ml

de chloroforme le mélange homogénéisé est de nouveau centrifugé 15 min à 8000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est transvasée dans un tube propre et l'ARN est précipité avec 26.6 ml d'éthanol 100% et 880 µl de NaCl 5 M pendant 16 heures.

L'ARN est finalement culotté par centrifugation 20 min à 8000 rpm à 4°C et lavé deux fois à l'éthanol 70% avant d'être resuspendu dans 200 µl d'eau additionnée de 10 unités d'inhibiteur de RNase (Boehringer Mannheim).

La concentration en ARN est estimée par lecture de la DO à 260 nm (1DO = 40 µg/ml).

2-2-Electrophorèse de gel d'ARN

L'électrophorèse d'ARN est réalisée dans un gel d'agarose en condition dénaturante afin que les ARNs perdent leur structure secondaire qui pourrait modifier leur mobilité électrophorétique.

Une solution d'agarose 1.2% (p/v) MOPS 1x est dissoute par chauffage. Lorsque la température est redescendue à 50°C, 17% (final) de formaldéhyde 37% sont ajoutés et le gel est coulé.

Les échantillons d'ARN sont additionnés de 50% de formamide désionisée, 10% (v/v) de MOPS 10x, 16% de formaldéhyde 37% avant d'être dénaturés pendant 5 minutes à 65°C puis placés dans la glace. Avant d'être chargés sur le gel, 10% de bleu de charge (bleu de bromophénol 0.25%, xylène cyanol 0.25%, ficoll 15% EDTA 20 mM) sont ajoutés.

L'électrophorèse est conduite environ 16 heures (une nuit) à 30 V dans le tampon MOPS 1x.

Tampon MOPS 10x :

MOPS : 0.2 M,

NaAc : 50 mM

EDTA : 10 mM

pH 7.0 (NaOH)

2-3-Transfert de gel d'ARN

Avant le transfert, le gel est lavé 5 min dans l'eau puis 5 min dans une solution de SSC 5x (§ 1-4), afin d'éliminer en partie le formaldéhyde. Le gel est alors transféré sous vide sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) en présence de SSC 2x (§ 1-4).

L'ARN est fixé sur la membrane par un bain de NaOH 50 mM, puis rincé dans une solution de SSC 5x.

Une bandelette de membrane correspondant au marqueur de poids moléculaire peut être découpée et colorée au bleu de méthylène (acétate de sodium 0.5 M, pH 5.2, bleu de méthylène 0.04% (p/v)).

2-4-Hybridation (Northern-blot)

2-4-1-Préparation des sondes et marquage radioactif

Les sondes ADN utilisés pour l'hybridation sont les produits d'amplification PCR des gènes d'intérêt purifiés sur colonne QIAquick. L'ADN est marqué radioactivement au $P^{32}\alpha$ -dCTP par Nick-Translation (Nick translation system, Gibco BRL). La sonde purifiée sur colonne QIAquick est éluée avec 50 μ l de tampon TE et 2 μ l sont prélevés pour le dosage de la radioactivité incorporée (§2-4, Méthodes d'Analyses Protéiques).

2-4-2-Conditions d'hybridation

La membrane est préhybridée 4 heures à 42°C dans un tube à hybridation avec la solution de préhybridation (formamide désionisée 50%, SSC 6x, solution de Denhardt 2x EDTA 0.5 mM, SDS 1% (p/v) et ADN de sperme de hareng 250 μ g/ml dénature 10 min à 100°C).

La solution de préhybridation est remplacée par la solution d'hybridation (solution de préhybridation avec la sonde à $1-2 \times 10^6$ cpm/ml dénaturée 10 min à 10°C) et la membrane incubée 16 à 42°C.

La membrane est lavée 2 fois 10 minutes dans une solution de SSC 1x et SDS 0.5 % (p/v) à température ambiante, puis à 65°C 1 fois 15 minutes dans une solution de SSC 1x et SDS 0.5 % et enfin 10 min dans SSC 1x.

La membrane est alors soigneusement égouttée et enveloppée dans un film plastique transparent avant d'être exposée sur 5 à 10 jours en cassette à -70°C.

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSIONS

PREMIÈRE PARTIE :

**PRÉAMBULE
ET
DESCRIPTION PHENOTYPIQUE DE LA CMS *G***

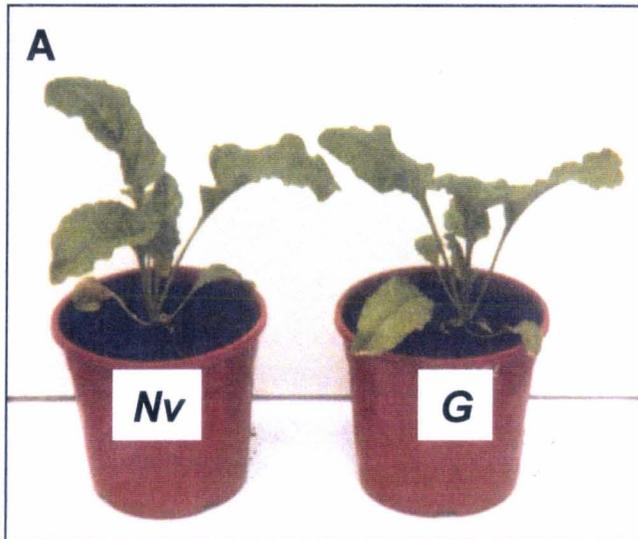


Figure 1 : Morphologie des betteraves sucrières portant le cytoplasme *Nv* (fertile) ou *G* (stérile). **A.** Plantes âgées de 6 semaines. **B.** Plantes en fleurs.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I – PRÉAMBULE ET DESCRIPTION PHÉNOTYPIQUE DE LA CMS *G*

A l'origine le parent donneur du cytoplasme stérilisant *G* est une betterave sauvage mâle-sterile (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) portant le cytoplasme *G*, pollinisée en population naturelle et localisée à Saint-Nazaire en Bretagne en 1989 (Saumitou-Laprade *et al.* 1993b). Les descendant stériles issus de cette pollinisation ouverte ont été croisés avec différentes lignées de betteraves sucrières (INRA Dijon). La stérilité male cytoplasmique a ensuite été maintenue par des back-cross successifs des descendants stériles avec les lignées de betteraves sucrières mainteneurs de la stérilité, portant le cytoplasme *Nv*.

1-Phénotype générale de la CMS *G* en betterave sucrière

Au sein des différentes paires des lignées quasi-isogéniques, nous n'avons constaté aucune variation notable du taux de germination, du développement et aucune autre altération phénotypique que la stérilité mâle sur les plantes portant le cytoplasme *G* comparées aux plantes fertiles portant le cytoplasme *Nv* dans les conditions standard de croissance en serre (20-22°C avec 16 heures d'éclairage) (Figures 1A et 1B).

2-Description des fleurs stériles et fertiles

La CMS *G* maintenue dans les lignées de betteraves sucrières se caractérise par l'absence totale de pollen dans les fleurs. Lorsque les fleurs de plantes hermaphrodites laissent apparaître des anthères jaunes pleines de pollen qui deviennent déhiscentes et laissent échapper le pollen par ouverture des loges polliniques (Figure 2A). Dans la CMS *G*, les anthères se nécrosent rapidement après l'ouverture de la fleur (Figure 2B). Elles deviennent rapidement entièrement brunes, se dessèchent et finissent par tomber prématurément de la fleur.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucune trace de pollen dans les anthères des lignées de CMS *G* cultivées, même immatures dans les boutons floraux. La comparaison

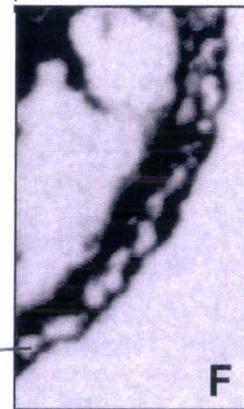
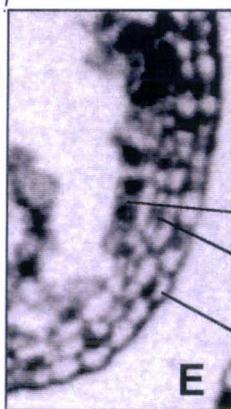
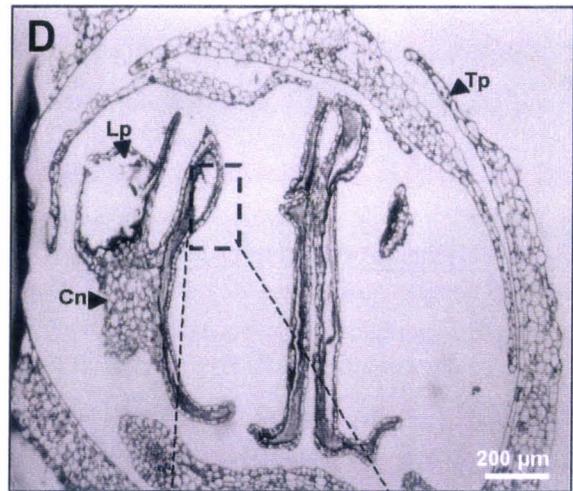
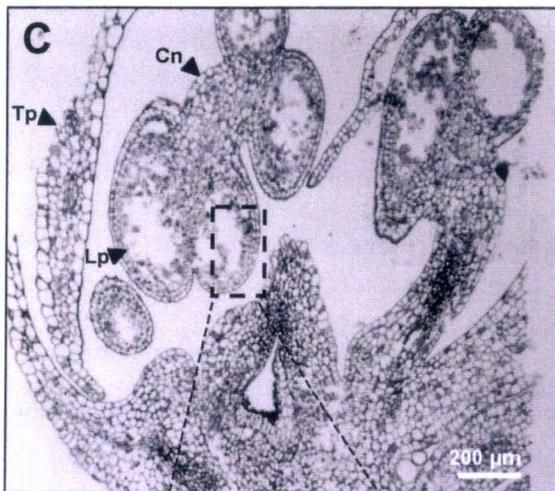
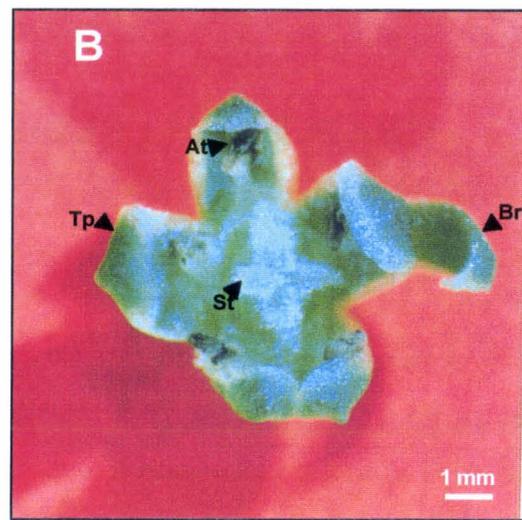
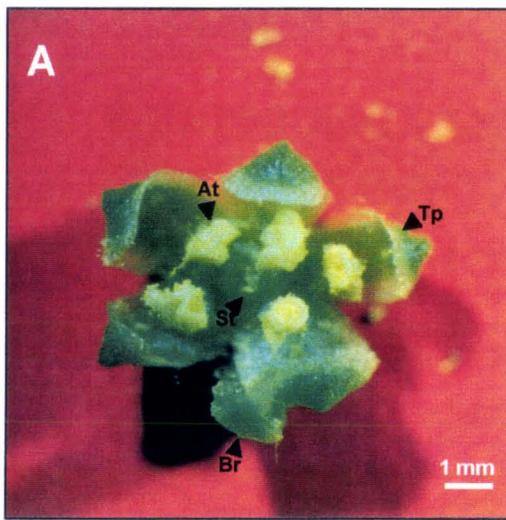


Figure 2 : Comparaison morphologique des fleurs stériles de la CMS *G* et de son mainteneur fertiles (*Nv*). **A.** Jeune fleur d'une plante *Nv* présentant des anthères fertiles, pleines de pollen. **B.** Jeune fleur d'une plante stérile *G* avec des anthères brunes sans pollen. **C.** et **D.** Vue microscopique des anthères de boutons floraux de *Nv* et *G* (stade pré-méiotique). **E.** et **F.** Détail des tissus des l'anthères *Nv* et *G*.

Notations :

- A. et B. :** At, Anthère; Br, Bractée; St, Stigmate; Tp, Tépale.
C. et D. : Cn, Connectif; Lp, Loge pollinique, Tp, Tépale .

des coupes réalisées sur de jeunes boutons floraux prélevés sur l'apex de la hampe florale de betteraves stérile ou fertile montre que la dégénérescence de l'anthère intervient à un stade très précoce de son développement dans les lignées de CMS *G*. Les anthères sont déformées et les loges polliniques sont vides (Figures 2C et 2D). Par ailleurs, les autres tissus visibles ne semblent pas affectés (tépales, connectif) et, globalement, la taille des anthères stériles est comparable à celle des anthères fertiles. Les plans détaillés de la paroi de l'anthère des fleurs fertile et stérile montrent chez cette dernière que les tissus périphériques de l'anthère sont profondément altérés (Figures 2E et 2F). En effet, on ne distingue plus dans l'anthère de la CMS *G* que la couche de cellules correspondant à l'épiderme. Les autres tissus apparaissent sous la forme d'une couche sombre, irrégulière, correspondant peut-être aux débris accumulés de ces tissus non développés (tapis, assise mécanique).

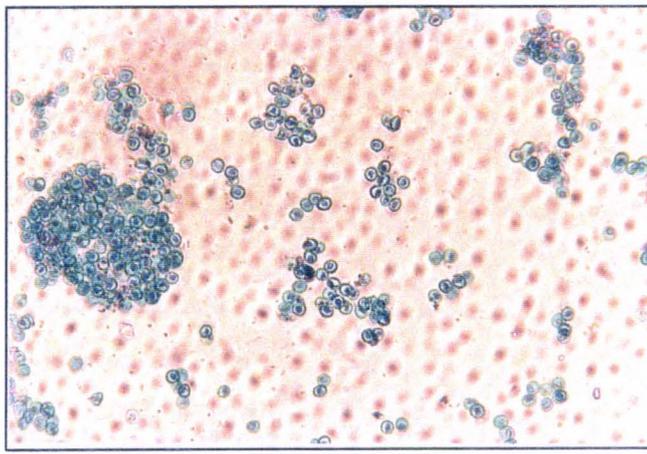
L'ensemble de ces observations indique que l'action des facteurs stérilisants de la CMS *G* est très précoce dans le développement de l'anthère, forcément pré-méiotique. Au départ de son développement, elle est restreinte à quelques tissus de l'anthère puis au cours de la maturation, affecte l'ensemble de l'anthère qui finalement brunit.

3-Taux de fertilité de la CMS *G* chez les betteraves sauvages

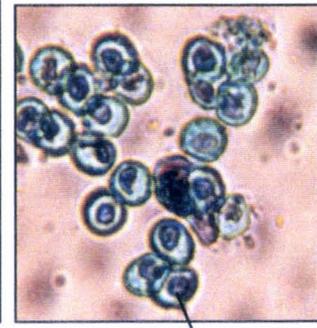
Dans un contexte naturel, l'expression de la stérilité mâle associée au cytoplasme *G* chez *Beta vulgaris* ssp. *maritima* peut apparaître sous différents phénotypes. Elle peut se traduire par un phénotype identique à celui observé sur les betteraves sucrières (anthères brunes sans pollen) ou bien avec des anthères jaune pâles, non déhiscentes, contenant de petits grains de pollen non viables (Figure 3).

La figure illustre la qualité du pollen de différents intermédiaires obtenus en croisant des plantes stériles *G* avec des plantes restaurées. Les phénotypes sexuels des descendants peuvent être divisés en trois groupes : stérile (CMS), intermédiaire et fertile (restauré). La restauration de la fertilité mâle apparaît alors plus quantitative que qualitative ce qui suggère l'implication de plusieurs gènes dans la restauration de la CMS *G*. En effet, les phénotypes intermédiaires décrits résultent peut-être de la variation de l'efficacité des différentes combinaisons de ces gènes de restauration (ou allèles) sur la production de pollen.

Stérile

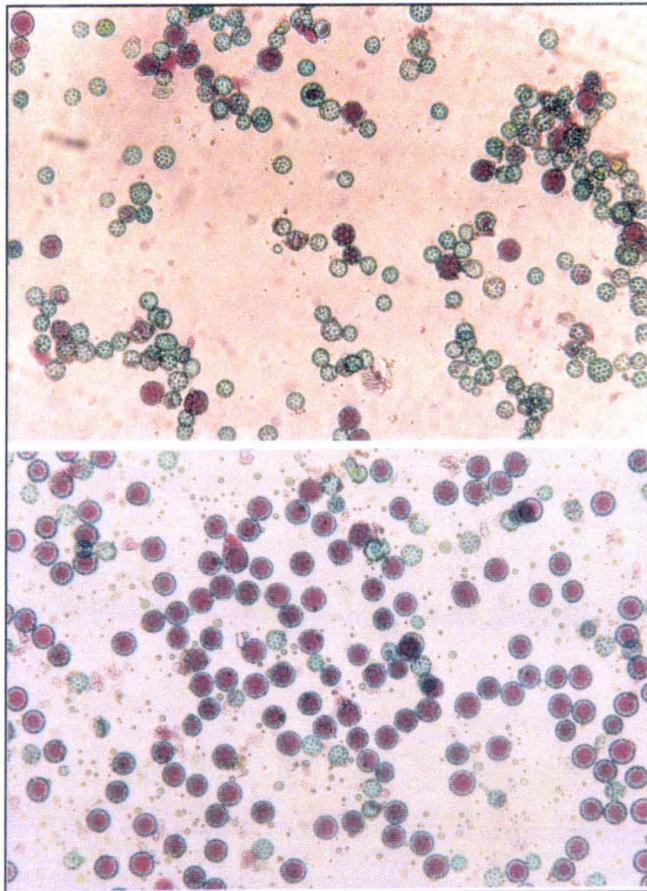


0%

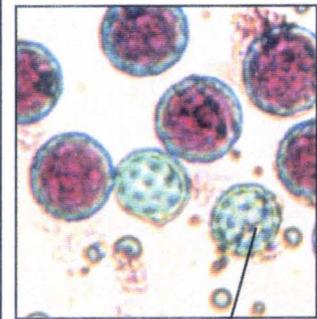


pollen avorté

Intermédiaires



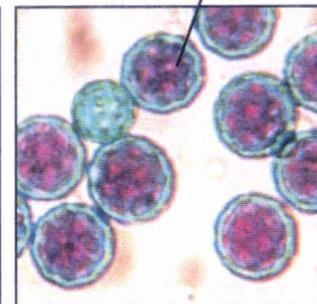
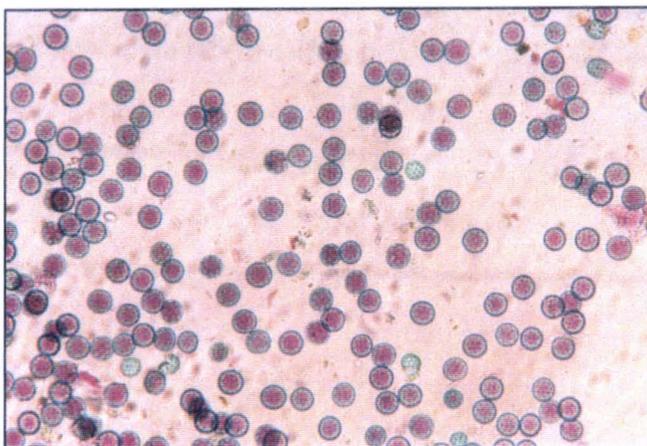
25%-75%



non 'viable'

'viable'

Fertile



75%-100%

Figure 3 : Variabilité dans la qualité de la production de pollen de fleurs de betteraves sauvages descendant d'un croisement de CMS *G* avec des CMS *G* restaurées. Les pourcentages indiquent les taux de pollen rose après coloration au vert d'Alexander.

Ces observations montrent que l'action des facteurs stérilisant de la CMS *G* peut être contrecarrée ou que leur expression peut-être prévenue dans un contexte nucléaire restaurateur. Elles révèlent de la variabilité phénotypique dans l'expression de la stérilité mâle qui se traduit par l'absence totale de pollen ou la présence de pollen avorté dans les anthères selon le contexte nucléaire.

L'utilisation de lignée de betteraves cultivées dans l'étude de la CMS *G* offre l'avantage considérable d'un contexte nucléaire contrôlé, sélectionné pour son maintien du caractère mâle stérile.

DEUXIEME PARTIE :

**ANALYSE DES PROTEINES
MITOCHONDRIALES DU CYTOPLASME G**

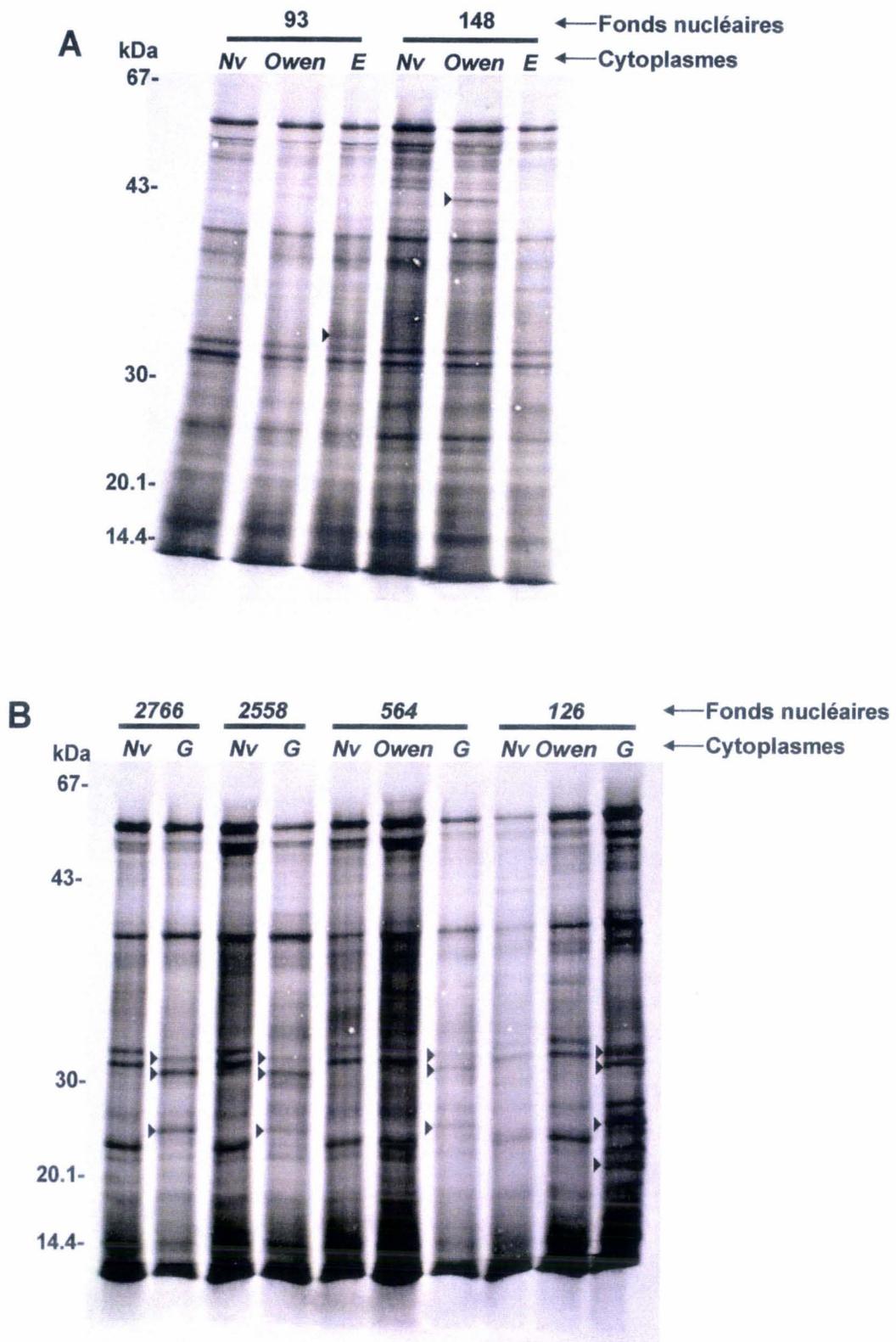


Figure 1 : Comparaison en SDS-PAGE 15% des profils de synthèse *in organello* obtenus à partir des cytoplasmes stérilisants *E* et *G* de la betteraves maritimes introduits dans différentes lignées de betteraves sucrières. Les flèches indiquent la position de bandes variantes **A.** *Nv*, cytoplasme fertile des betteraves mainteneurs des stérilités mâles cytoplasmiques *Owen* (origine cultivée) et *E* (origine maritime). **B.** *G*, stérilité mâle cytoplasmique *G* (origine maritime).

II – ANALYSE DES PROTEINES MITOCHONDRIALES DU CYTOPLASME G

1-Identification de polypeptides mitochondriaux associés au cytoplasme G

1-1-Comparaison des profils d'expression protéique mitochondriale en synthèse *in organello* des cytoplasmes *Nv* et des CMS *Owen*, *E* et *G* de *Beta vulgaris*

La mitochondrie végétale renferme environ un millier de protéines différentes dont la plupart sont codées par le noyau. Le séquençage du génome mitochondrial des végétaux supérieurs comme par exemple *Arabidopsis thaliana* (Unsel et al. 1997), *Beta vulgaris* (Kubo et al. 2000) ou encore *Marchantia polymorpha* (Oda et al. 1992), a révélé qu'il codait pour une 50^{aine} de gènes dont seulement une 30^{aine} de polypeptides appartenant essentiellement aux complexes de la chaîne respiratoire ou aux ribosomes. Une centaine d'*orfs* viendraient potentiellement s'ajouter à l'ensemble des protéines codées par la mitochondrie mais la totalité ne représente environ que 10% des protéines présentes dans la mitochondrie. Le marquage des protéines *in organello* permet donc d'avoir une vision globale de l'expression protéique du génome mitochondriale.

Chez le maïs (Dewey et al. 1987), le tournesol (Horn et al. 1991), le colza (Grelon et al. 1994), le pétunia (Nivison et Hanson 1989) ou encore le haricot (Johns et al. 1992), la comparaison des profils de synthèse *in organello* entre les cytoplasmes stériles et fertiles a permis de mettre en évidence, chez les plantes stériles, un polypeptide additionnel dont la présence a été corrélée à la stérilité mâle dans la plupart des cas. Nous avons donc appliqué cette méthode sur différentes CMS de *Beta vulgaris*.

La comparaison du profil d'expression mitochondrial de la CMS *E* avec la CMS *Owen* et le cytoplasme *Nv* (fertile) sur deux fonds nucléaires différents (93 et 148) ne permet pas d'attribuer de bande spécifique à ces CMS (Figure 1A). En effet, les bandes variantes observées sur la CMS *Owen* avec le fond nucléaire 93 et sur la CMS *E* avec le fond 148 ne sont observées que sur un fond nucléaire donné et en conséquence ne peuvent pas être strictement associées aux cytoplasmes stérilisants.

Le profil d'expression mitochondriale du cytoplasme stérilisant *G* ne révèle aucun polypeptides additionnels ou manquants (Figure 1B). Mais il se différencie des profils de synthèse *in organello* obtenus avec *Nv* et les CMS *Owen* et *E* par la présence de trois

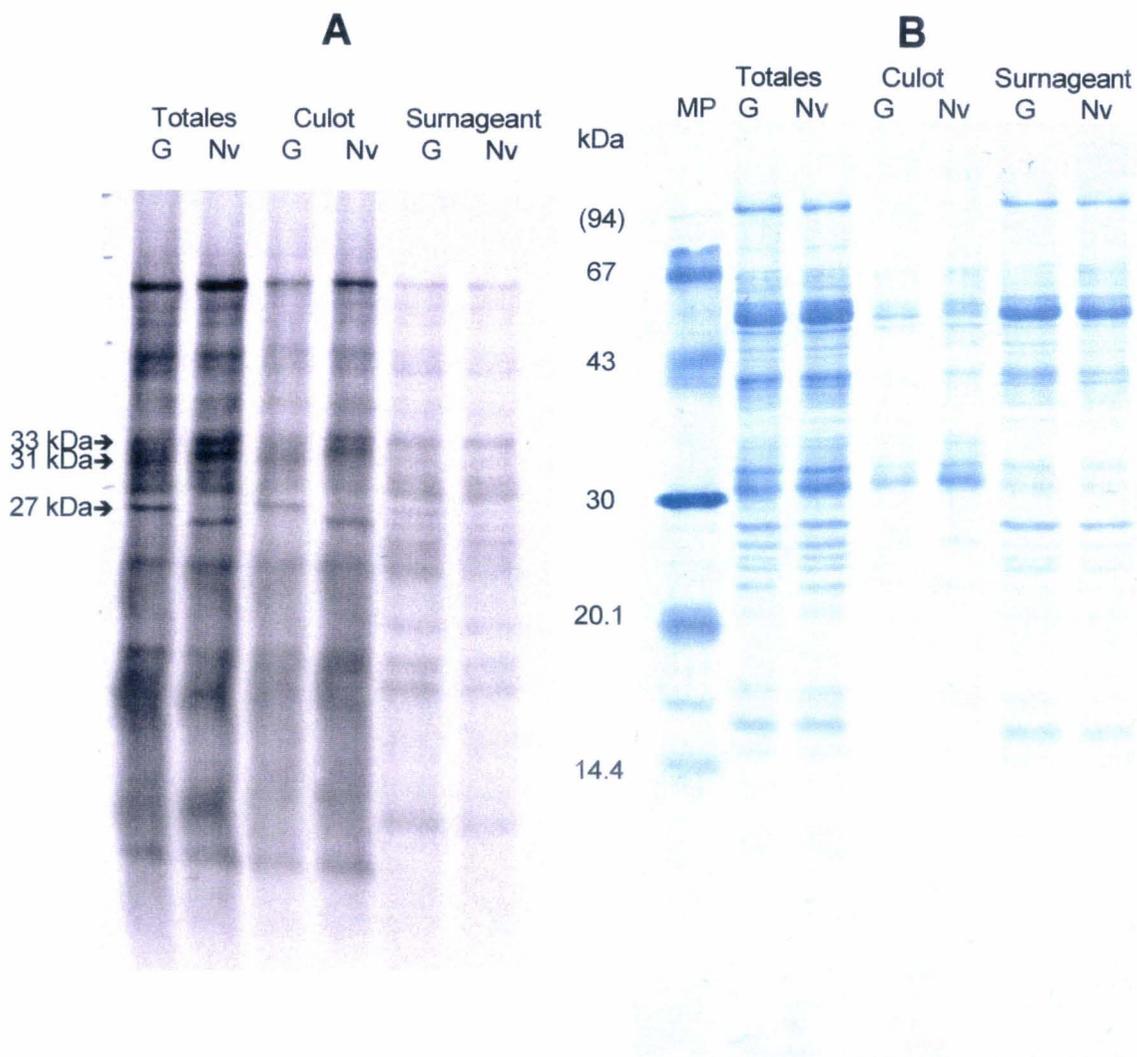


Figure 2 : Séparation des produits de synthèse *in organello* en SDS PAGE 12%-17% après sonication et ultracentrifugation. **A.** Autoradiogramme. Les variants de la CMS *G* sont indiqués avec les poids moléculaires par une flèche. **B.** Membrane colorée à l'amido-black; MP, marqueurs de poids moléculaires.

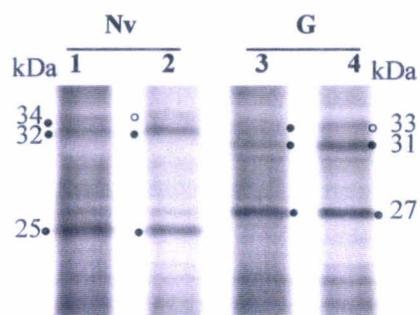


Figure 3 : Expérience de *pulse-chase*. Les protéines ont été marquées radioactivement *in organello* pendant 7 minutes (*pulse*) puis la méthionine- S^{35} a été chassée (lignes 2 et 4) ou non chassées (lignes 1 et 3) pendant 40 minutes avec 2.5 mM de méthionine froide (*chase*). Les cercles pleins (•) indiquent les bandes variantes et les cercles ouverts (◦) celles dont l'intensité décroît pendant la chasse.

bandes variantes de 27, 31 et 33 kDa. Ces variants sont observés sur les quatre fonds nucléaires testés ce qui permet de les associer strictement au cytoplasme *G*.

Les cytoplasmes stériles *E* et *Owen*, et fertile *Nv* possèdent le même profil que celui qu'avait obtenu Halldén (1992) sur différentes espèces du genre *Beta* parmi lesquels figuraient aussi les cytoplasmes *Nv* et *Owen*. Seules les CMS S3 (*B.v. ssp. cicla*) et S4 (*B.v. ssp. maritima*) qu'il avait utilisées avaient un polypeptide additionnel en plus du profil connu, de 8 et 10 kDa respectivement.

Le profil d'expression du cytoplasme *G* se distingue des autres profils connus chez *Beta vulgaris* par la présence de trois produits de synthèse spécifiques à ce cytoplasme. Notre attention s'est donc focalisée sur l'identification de ces produits de synthèse.

1-2-Caractérisation des polypeptides variants

Le cytoplasme *G* se caractérise donc par la présence de trois polypeptides de 27, 31 et 33 kDa. L'intensité du signal ainsi que le poids moléculaire relatif de ces polypeptides suggèrent qu'ils puissent être des variants en taille des polypeptides de 25, 32 et 34 kDa du cytoplasme fertile *Nv* (Figure 1B). Ils seraient donc les produits de gènes mitochondriaux présents aussi dans le cytoplasme fertile, certainement connus et de ce fait probablement impliqué dans les fonctions normales de l'organelle.

La séparation des fractions des protéines mitochondriales obtenue par sonication et ultracentrifugation, a permis de localiser les variants *G* observés en synthèse *in organello* dans la fraction membranaire correspondant au culot (Figure 2). Ils sont donc probablement de nature hydrophobe ou bien associés à des complexes mitochondriaux membranaires.

La différence de taille d'environ 2 kDa observée entre les polypeptides de 32 et 34 kDa (*Nv*), et 31 et 33 kDa (*G*) laisse supposer qu'ils puissent avoir la même origine et que les polypeptides de plus haut poids moléculaires (33 et 34 kDa) seraient les précurseurs de ceux de plus faibles poids (31 et 32 kDa, respectivement). L'expérience de *pulse-chase* vient appuyer cette hypothèse. En effet, pendant la durée du *pulse* les précurseurs synthétisés sont marqués radioactivement et maturés au fur et à mesure en produits de taille inférieure (Figure 3, lignes 1 et 3). Pendant la *chasse*, le marquage est considérablement atténué par l'incorporation de la méthionine non-marquée (en excès) et les précurseurs

marqués sont alors maturés. On constate effectivement que pendant la *chasse*, l'intensité des polypeptides de 33 et 34 kDa diminue nettement alors que celle des polypeptides de 31 et 32 kDa augmente (Figure 3, ligne 2 et 4).

L'ensemble de ces informations a permis d'orienter l'identification des variants du cytoplasme *G* vers les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, les 4 complexes et l'ATP synthase sont ancrés dans la membrane interne de la mitochondrie et, mis à part le complexe II, ils sont tous en partie constitués de polypeptides codés par la mitochondrie.

1-3-Identification des polypeptides variants

La sous-unité 2 de la cytochrome *c* oxydase est, chez la betterave, traduite en un précurseur de 29,5 kDa (préCOX2) maturé à 27,8 kDa (COX2) avant d'être assemblée dans le complexe IV (Herrmann *et al.* 1995) (poids moléculaires calculés d'après la séquence prédite en acides aminés). Elle est la seule sous-unité codée par la mitochondrie connue à ce jour chez la plante comme étant synthétisée dans un premier temps sous la forme d'un précurseur. L'hypothèse suggérée par l'expérience de *pulse-chase*, que les polypeptides de 33 kDa (*G*) et 34 kDa (*Nv*) pouvaient être préCOX2 et que ceux de 31 kDa (*G*) et 32 kDa (*Nv*), COX2, a été confirmé par le Western-blot réalisé avec l'antisérum anti-COX2 de maïs sur des fractions de protéines mitochondriales de *Nv* et *G* (Figure 4 ci-dessous).

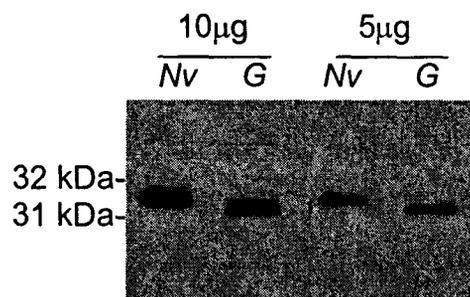


Figure 4 : Western-blot avec l'antisérum anti-COX2

Avec une taille apparente en SDS PAGE de 25 kDa pour *Nv* (27 kDa pour le variant *G*), le nombre de polypeptides mitochondriaux candidats correspondant aux critères déterminés auparavant est extrêmement réduit. En prenant une marge de 5 kDa couvrant une possible variation de taille entre la mobilité électrophorétique observée et le poids

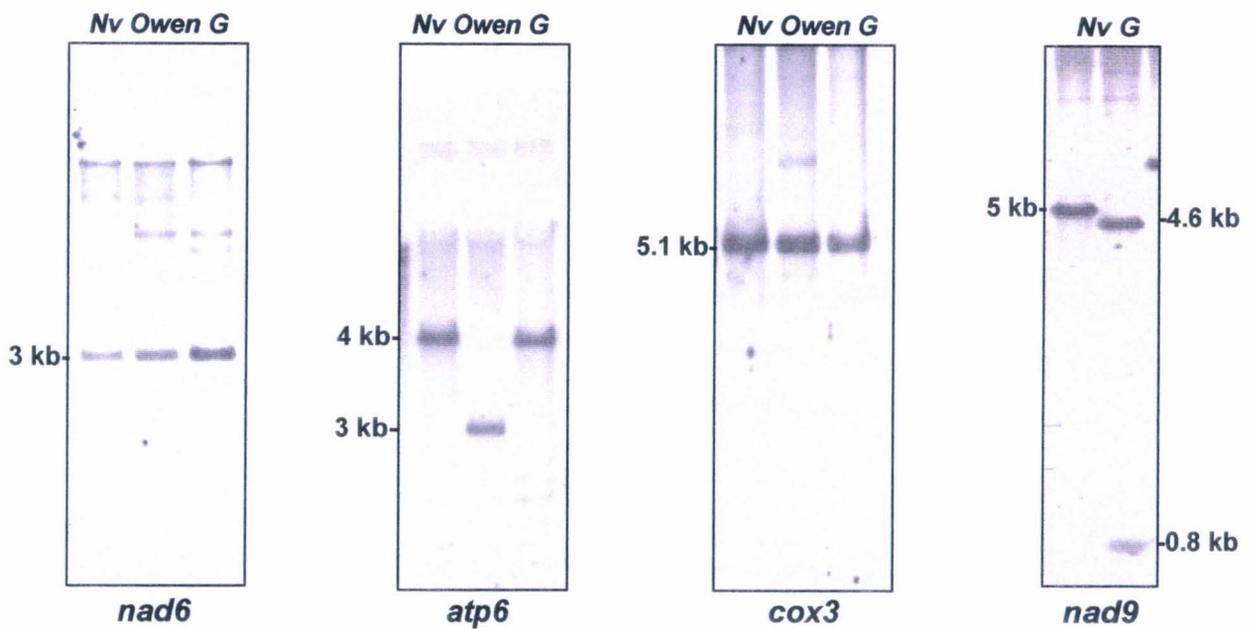


Figure 5 : Southern-blots réalisés avec les sondes correspondant aux gènes *nad6*, *atp6*, *cox3* et *nad9* sur l'ADN total de betteraves portant le cytoplasme *Nv*, *Owen* ou *G* digéré par *EcoR1*.

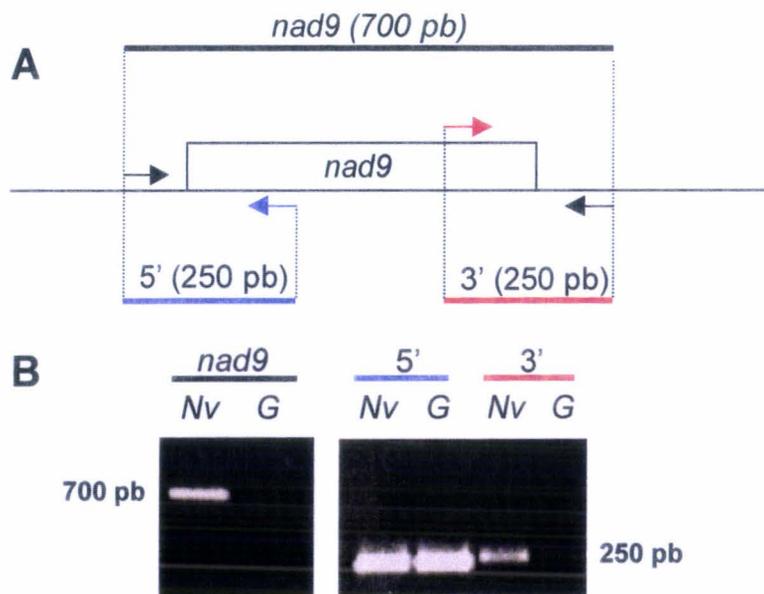


Figure 6 : Amplification PCR de *nad9*. **A.** Schématisation du gène *Nv nad9* avec les amorces utilisées et les produits PCR attendus. **B.** Résultat de l'amplification du gène *nad9* sur *Nv* et *G*, gauche. Résultat des amplifications 5' et 3' de *nad9*, droite.

moléculaire calculé à partir de la séquences en acide aminés, seules les sous-unités mitochondriales dont la taille était comprise entre 20 et 30 kDa ont été retenues comme candidats (voir Tableau 1, lignes grisées) : NAD6, NAD9, COX3 et ATP6.

Sous-unités par complexe : nombre totale	Taille (Da)
<i>NADH:ubiquinone oxydoréductase (C_I) : >30</i>	
NAD1	36030
NAD2	53777
NAD3	13660
NAD4 ¹	55373
NAD4L	10986
NAD5	74442
NAD6	23463
NAD7	44413
NAD9	22929
<i>Cytochrome c réductase (C_{III}) : 10</i>	
COB	44146
<i>Cytochrome c oxydase (C_{IV}) : 10</i>	
COX1	57580
COX2 ²	29534→27793
COX3	29742
<i>F1F0 ATP synthase (C_V) : >13</i>	
ATP α	54938
ATP6 ^{1,3}	28416
ATP8	18693
ATP9 ³	7492

Tableau 1: Tailles des sous-unités des complexes mitochondriaux codées par la mitochondrie chez *Beta vulgaris* calculées d'après la séquence ADN. ¹Première méthionine éditée ; ²Maturation post-traductionnelle; ³Codon STOP édité .

Des sondes homologues synthétisées par PCR pour chaque gène candidat ont été utilisées en Southern-blot pour comparer les profils d'hybridation des cytoplasmes *Nv*, *Owen* et *G* (Figure 5). Seul le profil d'hybridation révélé avec la sonde *nad9* est différent entre *Nv* et *G*. Par ailleurs, en utilisant les amorces définies à partir de la séquence *nad9* de *Nv* flanquant la séquence codante, aucune amplification PCR n'a été obtenue avec l'ADN extrait des plantes portant le cytoplasme *G*. Ceci suggérait que les extrémités 5' et/ou 3' de *nad9* était(ent) modifiée(s) chez *G* (Figure 6A). Des amorces définies à l'intérieur du gène *nad9* permettant une amplification indépendante des extrémités 5' et 3' combinées avec le premier jeu d'amorce *nad9* ont montré que la partie 3' était certainement modifiée chez *G* (Figure 6B).

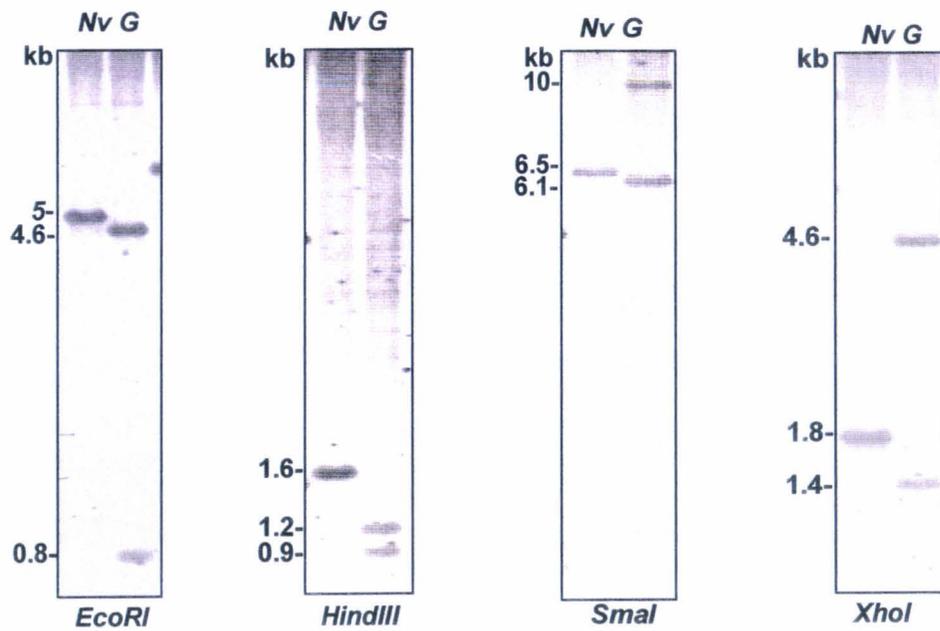


Figure 8 : Southern-blot sur l'ADN total extrait de plantes portant le cytoplasme *Nv* ou *G* digéré par différents enzymes de restriction avec une sonde *nad9*. Le poids moléculaire est indiqué en kilobases, kb.

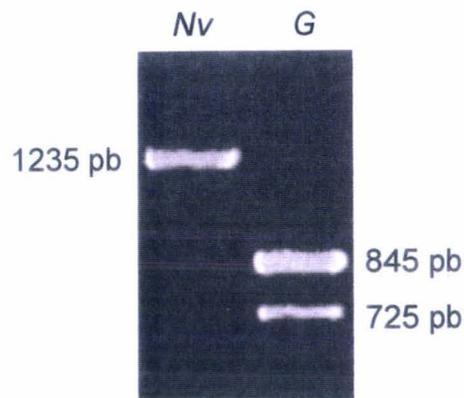


Figure 9 : Résultat de l'amplification obtenue par PCR inverse sur l'ADN total extrait de plantes portant le cytoplasme *Nv* ou *G* digéré avec *HindIII* et reliqué sur lui-même avec les amorces internes définies dans *nad9* (voir figure 5). La taille des fragments obtenus est indiquée en paire de bases, pb.

L'hypothèse que la sous-unité NAD9 du complexe I correspondait au polypeptide de 25 kDa chez *Nv* et 27 kDa chez *G* a été confirmée par Western-blot en utilisant un antisérum anti-NAD9 de blé (Figure 7).

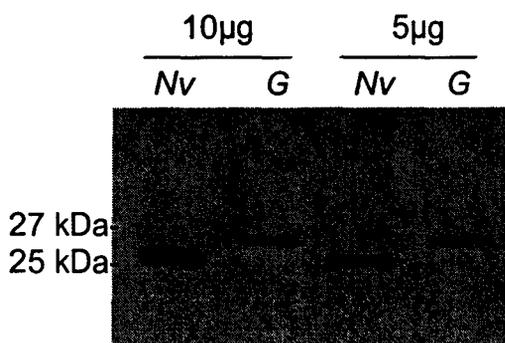


Figure 7: Western-blot avec l'antisérum anti-NAD9.

Les produits de synthèse *in organello* variant dans le cytoplasme *G* ont été identifiés. Il s'agit des sous-unités NAD9, COX2 et préCOX2. Elles appartiennent à deux complexes distincts de la chaîne respiratoire : la NADH:ubiquinone oxydoréductase (complexe I) et la cytochrome *c* oxydase (complexe IV). Chez *G*, NAD9 est plus grande que chez *Nv*, nous l'appellerons *grande-NAD9*. A l'opposé, COX2 est plus petite chez *G* et sera appelée *petite-COX2*.

2- Caractérisation moléculaire des sous-unités *nad9* et *cox2* du cytoplasme *G*

2-1- Analyse des séquences génomique et protéique de *nad9*

2-1-1- Séquence génomique du gène *nad9*

La comparaison des profils de restriction entre *Nv* et *G* avec la sonde *nad9* suggère que le cytoplasme *G* possède deux copies du gène *nad9*. En effet, quelque soit l'enzyme de restriction utilisée (*EcoR1*, *HindIII*, *SmaI*, *XhoI*), les Southern-blots révèlent deux bandes chez *G* et une seule chez *Nv*. Par ailleurs, les deux bandes de *G* ont des tailles différentes à celle observée chez *Nv* et une des deux copies a systématiquement une taille inférieure d'environ 400 paires de bases au fragment *Nv* (Figure 8).

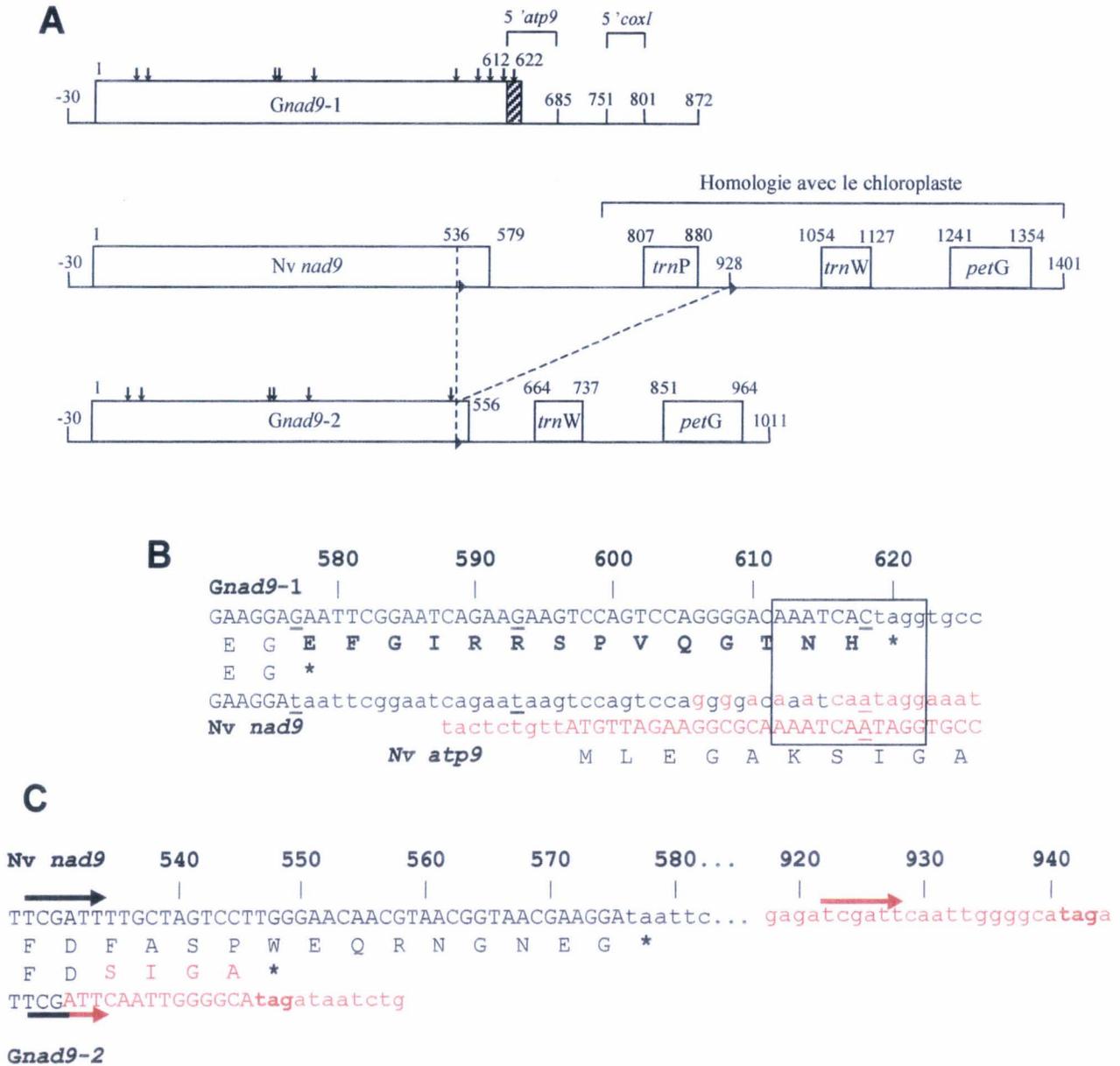


Figure 10 : Organisation génomique des gènes *Nv nad9* et *Gnad9-1* et 2. **A**. Schéma représentant les clones génomiques séquencés. Les nucléotides sont numérotés à partir du premier codon d'initiation de traduction de *nad9*. Les flèches verticales indiquent les points de mutations comparé à la séquences de TK81-O (Kubo *et al.* 1993). Les crochets horizontaux indiquent les segments d'ADN homologues à *atp9*, *coxI* et au chloroplaste. La délétion de *Gnad9-2* est indiquée en pointillés et les têtes de flèches verticales l'hexa-nucléotide répété. **B**. Séquences nucléotidiques et en acides aminés prédits du C-terminale de *Nv nad9* et *Gnad9-1*. Les nucléotides mutés sont soulignés et un astérisque (*) indique un codon-STOP. L'extention C-terminale de *grande-NAD9* est en caractères gras. La séquence *atp9* est en rouge. Le rectangle indique 11 nucléotides communs à *Gnad9-1*, *nad9* et *atp9*. **C**. Séquences nucléotidiques et en acides aminés prédites du C-terminale de *Nv nad9* et *Gnad9-2*. La séquence homologue au chloroplaste est en rouge. Les flèches indiquent les hexanucléotides flanquant la délétion de *Gnad9-2*.

Les amorces PCR flanquant la séquence *Nv nad9* ne permettant pas d'amplifier *nad9* chez *G*, nous avons utilisé la PCR inverse pour déterminer les séquences flanquantes de *G nad9*. L'enzyme de restriction *HindIII* donnant en Southern des fragments de tailles relativement petites (902 et 1022 pb), faciles à cloner, a été choisie pour la PCR inverse avec les amorces précédemment définies à l'intérieur du gène. La PCR inverse a révélé le fragment de 1235 pb attendu pour *Nv* et deux fragments de 725 et 845 pb chez *G* dont la taille correspond aux deux fragments *HindIII* moins la partie interne de *nad9* (Figure 9).

Le séquençage des deux copies de *nad9* (*Gnad9-1* et *Gnad9-2*) du cytoplasme *G* a révélé plusieurs mutations dans les gènes et semblent indiquer que de nombreux réarrangements du génome mitochondrial séparent *G* et *Nv* (Figure 10A).

Gnad9-1 correspond au fragment de 725 pb obtenu par PCR inverse. Comparé à la séquence de *Nv nad9*, *Gnad9-1* présente 10 substitutions nucléotidiques dont 5 impliquent un changement d'acides aminés et une, située dans le codon-STOP, résulte dans l'extension de la région codante de 14 codons (Figure 10B). *Gnad9-1* est fusionné en son extrémité 3' avec un segment de 80 pb 95% homologue avec la partie 5' du gène *atp9*, puis un fragment de 58 pb d'origine inconnue et un fragment de 51 pb partageant 92% d'homologie avec la 5' non codant du gène *cox1*. Une séquence de 11 nucléotides commune à *nad9* et *atp9* est certainement impliquée dans l'événement de recombinaison menant à la fusion *nad9/atp9* (Figure 10B). Par ailleurs, des amorces définies autour du gène *Nv atp9* ont permis d'amplifier et de séquencer chez *G* un gène *atp9* identique à celui de *Nv* indiquant qu'une copie intacte d'*atp9* existe dans le cytoplasme *G*.

Gnad9-2 partage les mêmes mutations que *Gnad9-1* suggérant que la duplication de ce gène soit survenue après les mutations. Il a conservé la structure génomique de *Nv nad9* mais une délétion de 390 pb située dans la partie 3' du gène réduit la taille de l'*orf* de 9 codons (Figure 10C). Ce fragment délété est flanqué directement par deux hexanucléotides de même orientation (5'-TCGATT-3') probablement impliqués dans le réarrangement ayant conduit à la délétion. Cette nouvelle *orf* code potentiellement pour un polypeptide de 21,7 kDa plus petit que *Nv NAD9* (22,3 kDa).

L'*orf* *Gnad9-1* codant potentiellement pour un polypeptide de 24,4 kDa, plus grand que *Nv NAD9*, le polypeptide de 27 kDa observé chez *G* en Western-blot (25 kDa chez *Nv*) correspond certainement au produit de ce gène. Aucun autre polypeptide de plus petite taille pouvant correspondre au produit de *Gnad9-2* n'a été révélé en Western-blot.

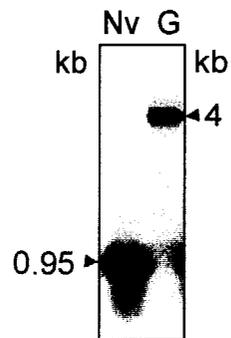


Figure 11 : Northern-blot réalisé avec une sonde *nad9* avec environ 10 μg d'ARN totaux extraits de plantes portant le cytoplasme *Nv* ou *G*.

Bien que deux gènes *nad9* aient été séquencés chez *G*, un seul transcrit a été observé en Northern-blot (Figure 11). Ce transcrit correspond certainement à *Gnad9-1* codant pour une protéine plus grande. Le transcrit *nad9* est quatre fois plus grand chez *G* (4 kb) que chez *Nv* (0,95 kb) ce qui laisse supposer qu'il pourrait être co-transcrit avec un autre gène mitochondrial, ce qui a déjà été décrit pour d'autres gènes mitochondriaux, par exemple chez le radis (Makaroff *et al.* 1989), *Brassica napus* (Singh et Brown 1991) ou le blé (Gray et Spencer 1983).

Puisque aucun transcrit, ni protéine n'ont pu être attribués à *Gnad9-2*, ce gène ne semble pas exprimé, tout au moins à un niveau détectable. Toutefois, la séquence et les Southern-blots montrent que *Gnad9-2* a conservé la même organisation génomique que l'unique exemplaire de *Nv nad9* puisque quel que soit l'enzyme de restriction utilisée la variation de taille de 400 pb observée sur les profils d'hybridations, correspond certainement à la délétion décrite et non à des réarrangements en 5' ou 3' du gène. Contrairement à la partie 3' délétée, la partie 5' a certainement conservé une structure identique à *Nv* comprenant la région nécessaire à l'initiation de la transcription. Il est donc raisonnable d'imaginer que la transcription est amorcée et que *Gnad9-2* possède un ARN non détecté en Northern car instable. En effet, Bellaoui *et al.* (1997) montrent l'importance de l'extrémité 3' des transcrits mitochondriaux et de leur structure secondaire dans leur stabilité. Par ailleurs, Kubo *et al.* (1995b) montrent que le fragment d'origine chloroplastique contenant *trnP* n'est pas transcrit chez *Nv*. La partie 3' terminale du transcrit est donc certainement située avant le *trnP* chloroplastique et est donc entièrement délétée chez *Gnad9-2*. Ce gène est donc potentiellement transcrit mais l'interruption du 3' par délétion le rend instable et, rapidement dégradé, indétectable.

L'organisation génomique de *Gnad9-1* et *Gnad9-2* reflète un grand nombre d'événements de recombinaison séparant *G* et *Nv*. Par ailleurs, le grand nombre de mutations ponctuelles accumulées dans la séquence codante de ce gène reste énigmatique. En effet, il est largement supérieur au nombre de substitutions trouvées par exemple en comparant les séquences codantes de *nad9* de deux espèces différentes du genre *Beta* : *Beta trigyna* et *Beta webbiana* (Tableau 2).

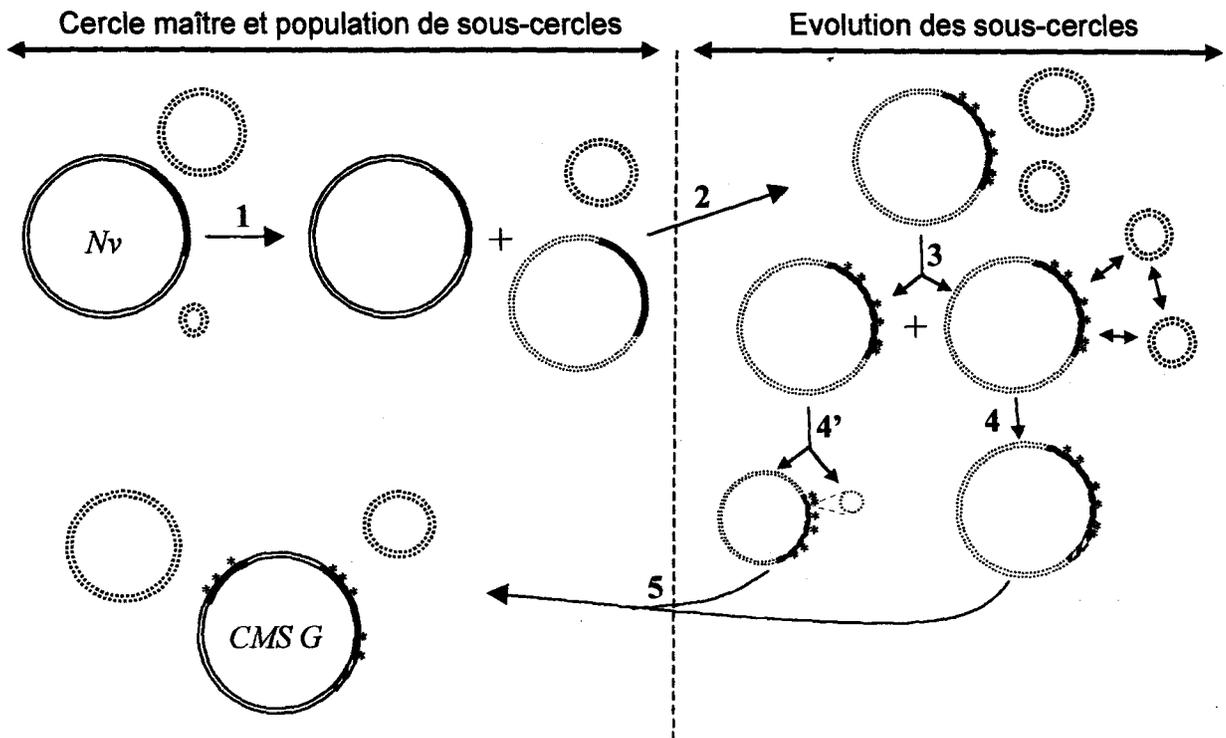


Figure 12 : Modèle d'évolution du génome mitochondrial décrivant 5 étapes essentielles entre l'organisation de *Nv* et *G*. Les arcs de cercles noirs représentent les gènes *nad9*. Les cercles en traits pleins sont les cercles maîtres et ceux en pointillés des cercles sous-génomiques. Les astérisques (*) représentent des points de mutations.

- 1-Duplication de *nad9* maintenue en sous-cerle
- 2-Génération des mutations dans *nad9*
- 3-Duplication de *nad9* mutée
- 4-Recombinaison inter-génomique → constitution du 3' chimérique de *Gnad9-1*
- 4'-Recombinaison intra-génomique → délétion de 390 pb du 3' de *Gnad9-2*
- 5-Intégration dans le cercle maître ('remplacement' de *nad9* normale)

<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> (<i>Nv</i>) comparé à	Substitutions Nucléotidiques	Changements d'acides aminés
<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> (CMS <i>G</i>)	10 (/622)	5 + C _{terminal} (/193)
<i>Beta trigyna</i> *	1 (/622)	1 (/193)
<i>Beta webbiana</i> *	3 (/622)	2 (/193)

Tableau 2 : Taux de mutation de *nad9* et modifications de la séquence en acides aminés chez différentes espèces et sous-espèces du genre *Beta*. *(Kubo *et al.* 1995b).

Cette accumulation de mutations dans le gène *nad9* pourrait être le résultat d'une évolution génomique particulière par le biais de molécules sous-génomiques. En effet, plusieurs modèles impliquant des recombinaisons avec les cercles sous-génomiques ont été développés pour déterminer les liens entre différents mitotypes au sein d'une même espèce (Bellaoui *et al.* 1998, Fauron *et al.* 1995, Small *et al.* 1989). Une évolution par l'intermédiaire de cette voie pourrait expliquer la fréquence élevée de mutations dans *Gnad9-1* et 2. En effet, les sous-cercles ne sont pas (ou peu) exprimés (Laser *et al.* 1997), ils ne sont pas soumis à la pression de sélection et par conséquent accumulent plus facilement des mutations avec une contrainte moindre. L'évolution de *nad9* par cette voie avant d'être réintégrée dans le cercle maître, serait une explication possible aux nombreuses modifications observées chez *Gnad9-1* et 2.

Par ailleurs, la séquence de 58 pb d'origine inconnue, localisée dans la région 3' de *Gnad9-1* ne présente effectivement aucune homologie avec le génome mitochondrial de la betterave fertile séquencé (Kubo *et al.* 2000). Ceci renforce l'hypothèse que le passage du cytoplasme *Nv* à *G* a nécessité, en plus des réarrangements intra-chromosomiques, l'implication de phénomènes rares comme l'incorporation d'ADN étrangers dans le génome mitochondrial, peut-être par l'intégration de molécule d'ADN sous-génomique n'appartenant pas au cercle maître décrit chez la betterave fertile.

Un modèle d'évolution du génome mitochondrial aboutissant à la structure de *Gnad9-1* et 2 nécessite au moins 5 grandes étapes comprenant des duplications et des recombinaison génomiques schématisées dans la figure 12.

2-1-2-Modification de la structure primaire prédite de la protéine NAD9

Parmi les 10 mutations identifiées dans la séquence de *Gnad9-1*, 5 se traduisent par un changement d'acide aminé et une, localisée dans le codon STOP, induit une extension C-terminale de 14 résidus spécifiques à *grande-NAD9* (Tableau 3). Aucune

		10	20	30	40	50	60	70
			1	2				
B. vulgaris G		MDNQFIFKYSWET	LPKKVWVKIEKLEHGNRSDTNTDYPFQLLC	FLKLHTYTRFQVLI	DICGVDYPSRKRR			
B. vulgaris Nv		MDNQFIFKYSWET	LPKKVWVKIEKSEHGNRSDTNTDYPFQLLC	FLKLHTYTRFQVLI	DICGVDYPSRKRR			
B. trigyna		MDNQFIFKYSWET	LPKKVWVKIEKSEHGNRSDTNTDYPFQLLC	FLKLHTYTRFQVLI	DICGVDYPSRKRR			
B. webbiana		MDNQFIFKYSWET	LPKKVWVKIEKSEHGNRSDTNTDYPFQLLC	FLKLHTYTRFQVLI	DICGVDYPSRKRR			
Solanum		MDNQFIFKYSWET	LPKKVWVKMERSHGNRSDTNTDYLQLLC	FMKLHTYTRVQVSI	DICGVDYPSRKQR			
Arabidopsis		MDNQFIFKYSWET	LPKKVWVKMERSHGNRSDTNTDYLQLLC	FLKLHTYTRVQVSI	DICGVDHPSRKRR			
Oryza		MDNQSIFQYSWEI	LPKKVWVKMKRS	EHGNRSYTNTDYPFLLC	FLKWHYTRVQVSI	DICGVDHPSRKRR		
Triticum		MDNQSIFQYSWEI	LPKKVWVKMKRS	EHGNRSYTNTDYPFLLC	FLKWHYTRVQVSI	DICGVDHPSRKRR		
Marchantia		MDNQLFFKSLIAT	LPK-WIHKQTS	KHENILYTNPNLSFLQLLY	FLKYHTNTRFKVLI	DICGVDYPSRKRR		
Bos taurus	/	HKQLSAFGEYVAEI	LPKYVQVQVSCFNELEIC	IHPDGVIPVLT	FLRDHSNAQFKSLADLTA	VDIPTRQNR		
Neurospora	/	ADNLHKYGSWLMGC	LPKYIQQFSV-WKDELTI	YISPAGVIVFVS	FLKYNTAAEYQVSD	ITAVDFPTKDQR		

		80	90	100	110	120	130	140
			3					
B. vulgaris G		FEVVYNLLSTRYNSRIRVQ	TCADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
B. vulgaris Nv		FEVVYNLLSTRYNSRIRLQ	TCADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
B. trigyna		FEVVYNLLSTRYNSRIRLQ	TSADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
B. webbiana		FEVVYNLLSTRYNSRIRLQ	TSADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
Solanum		FEVVYNLLSIRYNSRIRVQ	TSADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
Arabidopsis		FEVVYNLLSTRYNSRIRVQ	TSADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
Oryza		FEVVHLLSTRYNSRIRVQ	TSADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
Triticum		FEVVHLLSTRYNSRIRVQ	TSADDEVTRISPVVSLF	PSAGRWERE	VWDMFGVSS	INHPDLRRI	LDYGFEGHP	
Marchantia		FEVVYNLLSIDYNTRIRIL	TSVDEITPICSVS	IFPSAGW	WERETWDMFGVY	FSNHPDLRRI	LDYGFEGHP	
Bos taurus		FEIVYNLLSLRFNSRIRV	KTYTDELTP	IESSVPVYK	ANWYERE	IWDMFGVFFAN	HPDLRRI	LDYGFEGHP
Neurospora		FEVVYNLLSVRHNSRIRV	KTYADEVSPVPS	ITPLYD	GANWYB	REVDLFGVFF	TGHPDLRRI	LDYGFEGHP

		150	160	170	180	190	200	206
				4		5	6	
B. vulgaris G		LRKDFPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQELRYFDF-ASPWEQGN	---	GNEG	EFGI	RRSPVQGTNH
B. vulgaris Nv		LRKDFPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRN	---	GNEG		
B. trigyna		LRKDFPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRN	---	GNEG		
B. webbiana		LRKDFPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRN	---	GNEG		
Solanum		LRKDLPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRS	---	DG		
Arabidopsis		LRKDLPLSGYVQVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRS	---	DG		
Oryza		LRKDFPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRS	---	DG		
Triticum		LRKDFPLSGYVEVRYDD	PEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQRS	---	DG		
Marchantia		LRKDFPLSGYVEVRYDD	SEKRVVSEPI	EMTQEFRYFDF-ASPWEQMS	---	RSDES	SNQK	
Bos taurus		FRKDFPLSGYVELRYDD	EVKRVVAEP	VELAQEFRKFDL-NSPWEAF	PA-YRQP	PESL	KLEAG-DTK	PEAK/
Neurospora		LRKDFPMTGYTEIRYDE	EKKRIVTEP	LEMTQAFRN	FE	GGSS	AWEQV	GAGIDRKPESFKLPTPKPETKPEEKK

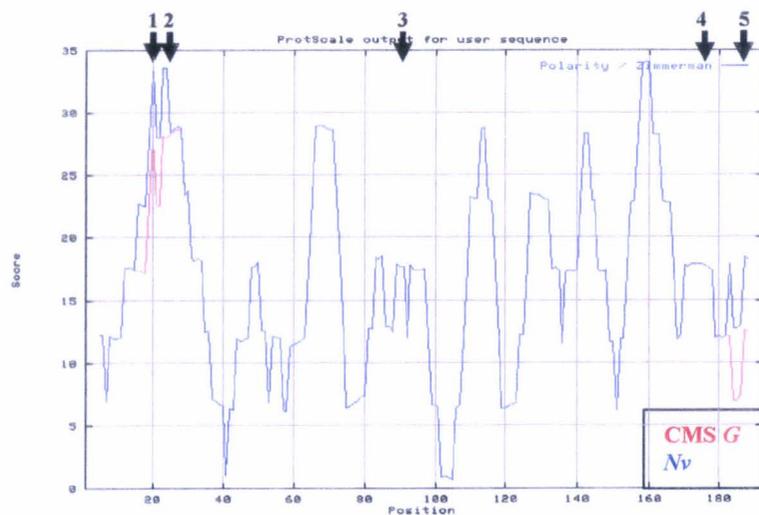


Figure 13 : Analyse des modifications en acides aminés de grande-NAD9. **A.** Alignements de séquences des sous-unités NAD9 de *Beta vulgaris G* (AF276428), *Beta vulgaris Nv* (Q37787) *Beta trigyna* (Q33994), *Beta webbiana* (Q34011), *Solanum tuberosum* (P80261), *Arabidopsis thaliana* (Q95748), *Oryza sativa* (Q35322), *Triticum aestivum* (S39072), *Marchantia polymorpha* (P34944), *Bos taurus* (P23709), *Neurospora crassa* (P23710). Les acides aminés en rouge sont les plus conservés, puis en vert, puis en noir. Les acides aminés bleus sont différents mais de même nature. **B.** Comparaison des courbes de polarité des sous-unités NAD9 de *Nv* et *G* obtenues selon la méthode de calculé de Zimmerman (1968).

n'affecte de codons édités (Kubo *et al.* 1993) et seule la deuxième mutation qui, correspondant à un changement C en T, pourrait éventuellement être corrigée par éditng.

Mutations	<i>Nv</i>	<i>G</i>	Nature du changement
1	Lysine ²⁰ (AAA)	Thréonine (ACA)	basique → neutre
2	Sérine ²⁵ (TCA)	Leucine (TTA)	polaire → hydrophobe
3	Leucine ⁸⁸ (CTA)	Valine (GTA)	même groupe
4	Phénylalanine ¹⁷⁵ (TTT)	Leucine (TTG)	même groupe
5	Arginine ¹⁸⁷ (CGT)	Glycine (GGT)	basique → neutre
6	Codon STOP ¹⁹³ (TAA)	Glutamate (GAA)	extension C-terminale

Tableau 3 : Bilan des changements possible d'acides aminés de *grande-NAD9*

L'alignement réalisé à partir des séquences en acides aminés de différents organismes révèle la présence dans NAD9 de motifs extrêmement conservés au sein des espèces (Figure 13A, alignement réalisé avec *NPS@* (Combet *et al.* 2000)). Parmi les mutations observées chez *G*, les 1^{ère} et 2^{ème} sont localisées dans une zone relativement riche en acides aminés basiques (Lysine, K). Le profil théorique de polarité obtenu par le calcul (selon la méthode de Zimmerman *et al.* (1968)) semble indiquer que ces mutations modifient la charge globale du double pic polaire situé dans l'extrémité N-terminale de NAD9, affectant par ailleurs l'environnement du motif L-P-K très conservé (Figure 13B). La mutation 4 est localisée dans le motif très conservé Q-E(/A)-F-R situé dans la partie C-terminale de NAD9. Enfin, les mutations 5 et 6 (extension C-terminale) modifient aussi théoriquement la polarité de cette sous-unité. Mis à part la 3^{ème} mutation, l'ensemble de ces changements pourrait modifier les propriétés physico-chimiques de NAD9 et de ce fait ses structures secondaire et tertiaire. Assemblée dans le complexe I les interactions avec les autres sous-unités pourraient être sensiblement altérées, et l'activité et/ou la stabilité du complexe modifiées.

2-2-Analyse des séquences génomique et protéique de *cox2*

2-2-1-Séquence génomique du gène *cox2*

Chez la betterave, le gène *cox2* est constitué de deux exons séparés par un intron de 1462 pb, le tout représentant 2246 pb (Mann *et al.* 1991). L'analyse en Southern-blot de ce gène a été effectuée avec trois sondes générées par PCR correspondant à différentes parties

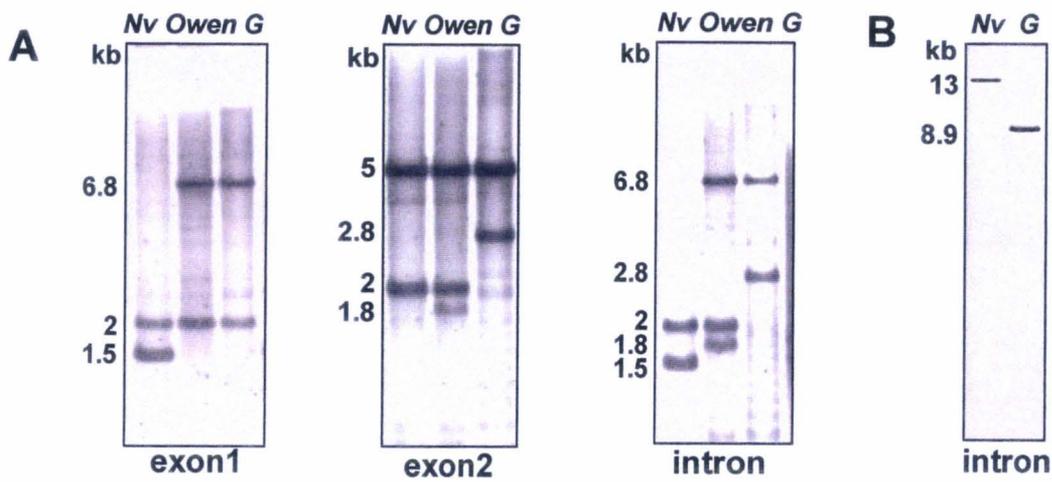


Figure 14 : A. Southern-blot sur l'ADN total extrait de plantes portant le cytoplasme *Nv*, *Owen* ou *G* digéré par *EcoR*I avec les sondes *cox2*. B. Southern-blot avec la sonde intron-*cox2* sur l'ADN des plantes *Nv* et *G* digéré par *Xba*I.

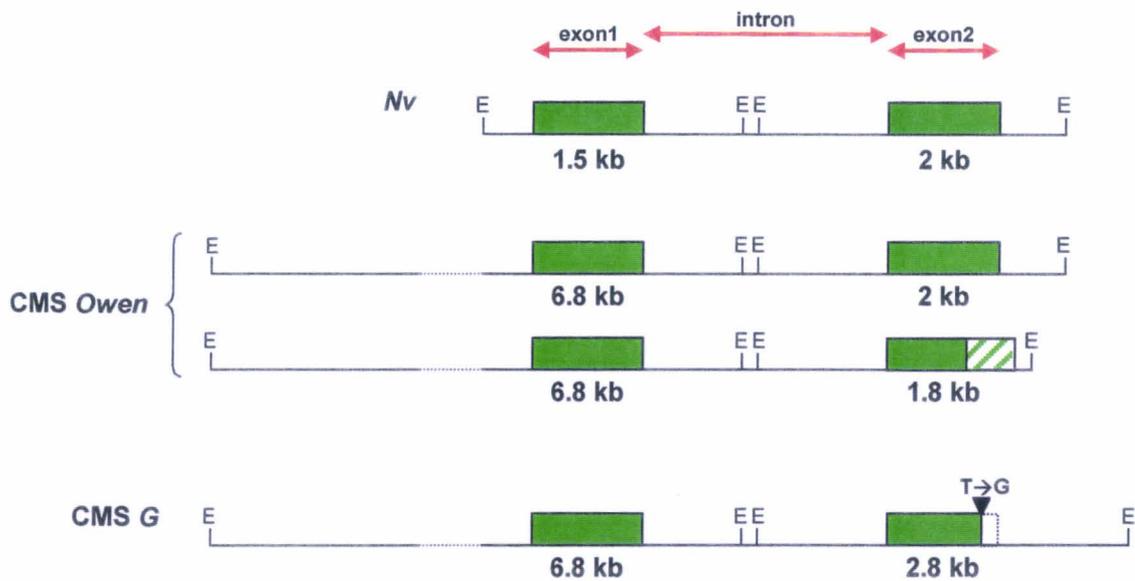


Figure 15 : Cartographie du gène *cox2* déduite de la figure 14A. Les flèches rouges indiquent la position des sondes utilisées. Le rectangle vert hachuré représente la partie tronquée de l'exon2 de la copie du gène pseudo-*cox2* de la CMS *Owen* (Senda *et al.* 1991). La mutation créant un codon STOP prématuré est indiquée dans la CMS *G*.

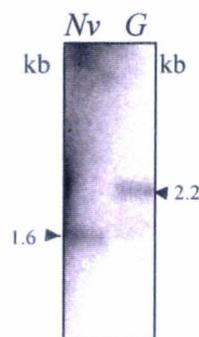


Figure 16 : Northern-blot réalisé avec une sonde *cox2*-exon1 avec environ 10 μ g d'ARN totaux extraits de plantes portant le cytoplasme *Nv* ou *G*.

du gène. La première correspond à l'exon 1, la deuxième à l'intron et la troisième à l'exon 2. Deux sites *EcoRI* situés dans la région centrale de l'intron permettent avec cette enzyme et les sondes correspondant aux exons 1 et 2 de différencier les extrémités 5' et 3' du gène. L'utilisation de l'intron comme sonde a permis de détecter le gène *cox2* "intact", c'est à dire possédant la structure 5'-exon1-intron-exon2-3', difficile à établir à cause de la présence d'un pseudo-*cox2*-exon1 décrit par Mann *et al.* (1991) hybridant aussi avec la sonde exon 1 (Figure 14A). La digestion *XbaI* indique que le gène *cox2* n'est présent qu'en une seule copie dans les deux cytoplasmes (Figure 14B)

Les profils d'hybridation obtenu avec les sondes *cox2* sur une digestion *EcoRI* ont permis de retrouver les profils de restriction décrits sur *Nv* et *Owen* par Senda *et al.* (1991) et d'établir la cartographie de *Gcox2* (Figure 15). Dans le cytoplasme *Nv*, les bandes de 1.5 kb et 2 kb correspondent respectivement aux extrémités 5' et 3' de *cox2*. Ce profil a déjà été décrit dans plusieurs espèces (*B. macrocarpa*, *B. patula*) et sous-espèces (*B.v. maritima*, *B.v. adanensis*) du genre *Beta* (Senda *et al.* 1995). La CMS *G* partage avec la CMS *Owen* le fragment de 6.8 kb comme extrémité 5' (Senda *et al.* 1991) mais le fragment de 2.8 kb est spécifique de *Gcox2* et correspond à l'extrémité 3'. Ces résultats suggèrent que les extrémités 5' et 3' de *Gcox2* aient été réarrangées par rapport à *Nv*.

La séquence de *Gcox2* a révélé la présence de quatre mutations dans l'intron et une mutation dans l'exon 2. Cette dernière est située dans le codon TTA de la leucine²⁵³ qui est muté en un codon-STOP TGA chez *G*. La présence de ce codon STOP prématuré raccourcit la protéine COX2 de 8 acides aminés au niveau C-terminal.

Enfin, l'analyse du Northern-blot réalisée avec une sonde correspondant à l'exon 1 de *cox2* révèle un seul transcrite dans les deux cytoplasmes. La différence de profil observée n'est pas surprenante puisque l'analyse en Southern-blot avait suggéré que les extrémités 5' et 3' chez *Gcox2* étaient réarrangées (Figure 16).

2-2-2-Modification de la structure primaire prédite de la protéine COX2

Chez la betterave, le gène *cox2* est traduit en une protéine précurseur de 260 acides aminés. Elle est maturée avant son assemblage dans le complexe IV par un clivage de l'extrémité N-terminal après le 14^{ème} acide aminé. Cette maturation se traduit par une baisse du poids moléculaire de 1,7 kDa. Cette différence de taille est cohérente avec celle observée en SDS-PAGE, d'environ 2 kDa, dans l'expérience de *pulse-chase* entre les préCOX2 et COX2 présumées.

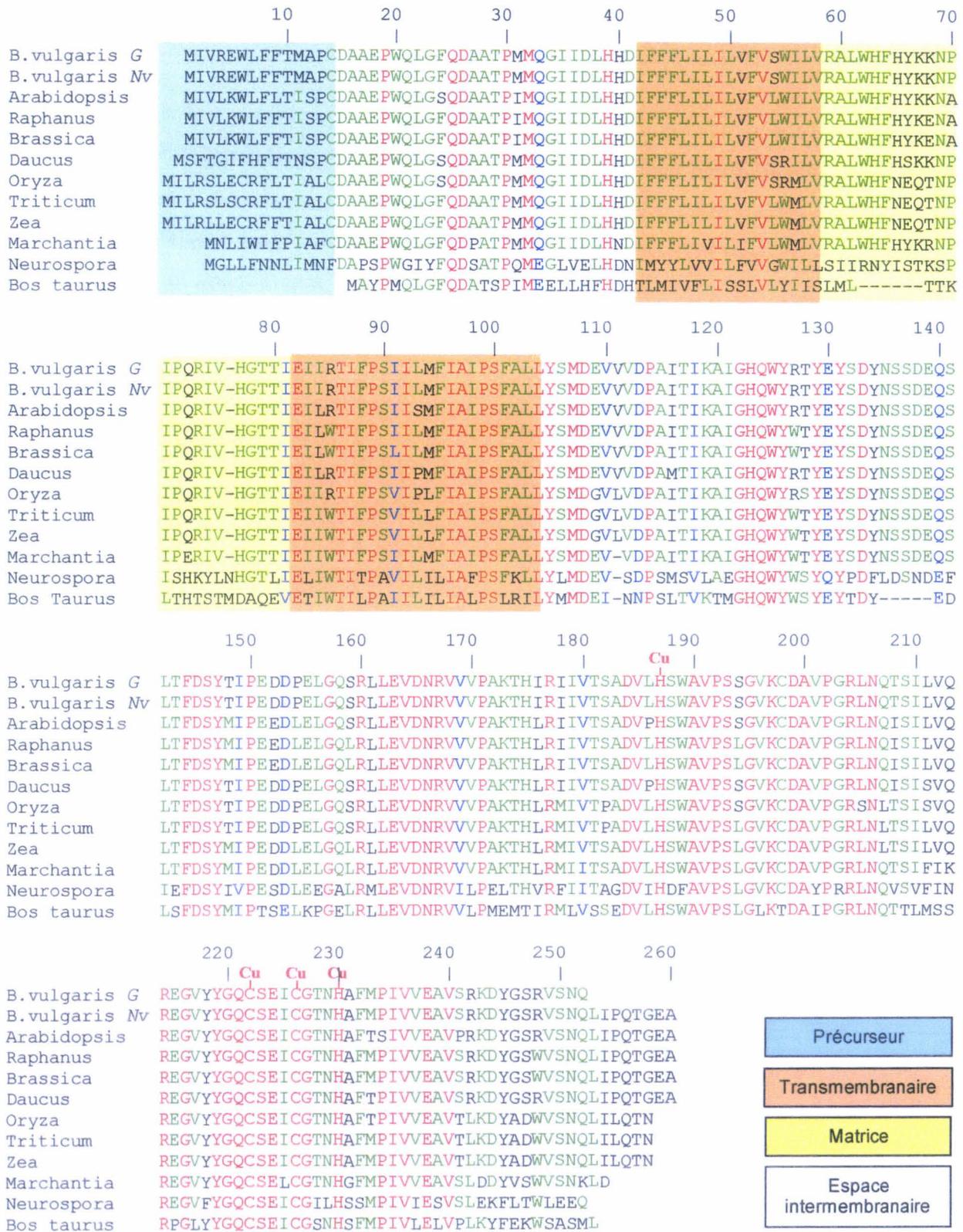


Figure 16 : Alignements de séquences en acides aminés des sous-unités COX2 de *Beta vulgaris G* (AF276430), *Beta vulgaris Nv* (P98012), *Arabidopsis thaliana* (Y08501), *Raphanus sativus* (AF036388), *Brassica rapa* (AF036386), *Daucus carota* (P27168), *Oryza sativa* (P04373), *Triticum aestivum* (P00413), *Zea mays* (P00412), *Marchantia polymorpha* (P26857), *Neurospora crassa* (P00411), *Bos Taurus* (P00404). Les acides aminés en rouge sont les plus conservés, puis en vert, puis en noir. Les acides aminés bleus sont des changements de mais de même nature. Les acides aminés constituant le centre cuivreux sont indiqués par **Cu**.

La perte des huit derniers acides aminés du C-terminal due à l'apparition d'un codon-STOP prématuré implique une différence de taille de 0.8 kDa ce qui correspond ici aussi à la différence d'environ 1 kDa observée en Western-blot.

Contrairement à NAD9, la structure et la fonction de la sous-unité COX2 sont bien connues. Avec les sous-unités COX1 et COX3, elle constitue le cœur réactionnel de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV). COX2 est ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie par deux hélices hydrophobes transmembranaires et les deux tiers de la protéine sont localisés dans l'espace intermembranaire (Figure 16). Elle possède un centre cuivreux (Cu_A) constitué par les acides aminés His¹⁸⁷-Cys²²²-Cys²²⁶-His²³⁰ conservé chez toutes les espèces alignées dans la figure 16 (alignement *NPS@* (Combet *et al.* 2000)). Bien que la partie C-terminale tronquée de *petite*-COX2 ne semble pas directement affecter le centre réactionnel, on constate que les 8 acides aminés manquant sont extrêmement conservés chez les dicotylédones et la leucine²⁵³ mutée en codon-STOP chez *G* est conservée chez les 9 espèces végétales alignées. On peut donc supposer que la modification du C-terminal de *petite*-COX2, située relativement proche des acides aminés impliqués dans la constitution du centre cuivreux, pourrait sensiblement ici aussi modifier la structure de cette sous-unité et par conséquent les propriétés du complexe IV auquel elle appartient.

2-3-Spécificité des modifications du cytoplasme *G*

L'analyse génomique du cytoplasme *G* a révélé un grand nombre de réarrangements du génome mitochondrial, en particulier pour constituer la structure des deux copies de *nad9*. Considérant l'ensemble des sondes utilisées dans cette étude et les études précédentes (Tableau 4), leur répartition tout autour du génome mitochondrial de la betterave (voir annexe I) suggère que ce soit l'ensemble du génome qui ait été remanié.

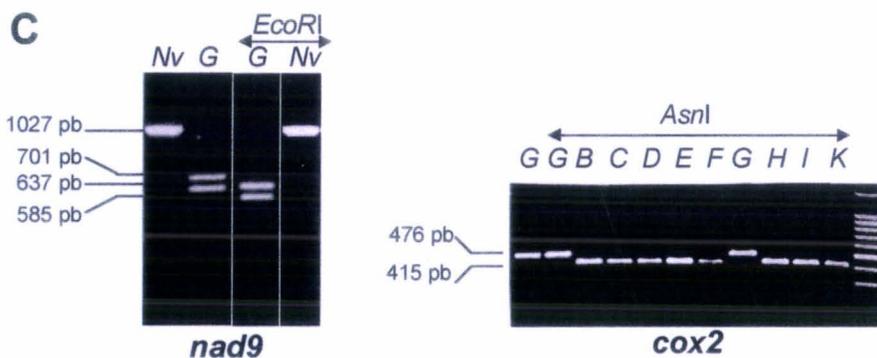
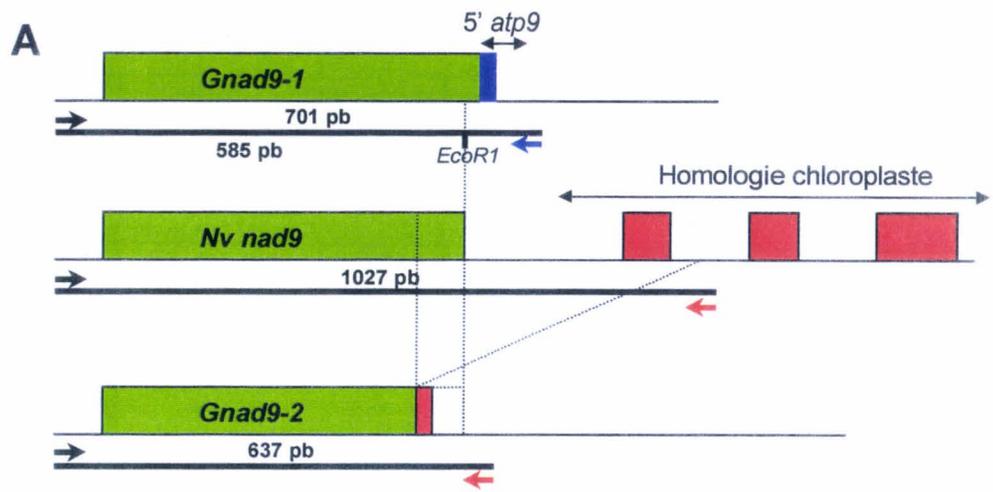


Figure 17 : Représentation de la méthode d'identification de *Gnad9-1* et 2 et *Gcox2* par PCR-restriction. **A.** Schéma représentant les amorces utilisées pour *nad9* avec les tailles des produits PCR obtenus, digérés ou non. **B.** Schéma pour *cox2*. **C.** Exemples de profils obtenus sur différents mitotypes.

Sondes	Profils d'hybridation sur digestion <i>EcoRI</i>	
	<i>Nv</i> (kb)	CMS <i>G</i> (kb)
<i>cox1</i> ¹	1,6	2,7
5' <i>cox2</i>	1,5	6,8
3' <i>cox2</i>	2	2,8
<i>atp9</i> ¹	1,2	1,2 (+ fusion 3' <i>Gnad9-1</i>)
	3,5 (pseudo- <i>atp9</i>)	2 (pseudo- <i>atp9</i>)
<i>nad9</i>	5	4,6 + 0,9
<i>pBv4</i> ¹	3,0 + 7,2	1,5 + 3,0
<i>ToN2</i> ²	15.1 + 12.5 + 10.9 + 10.2	15.1 + 10.2

Tableau 4 : Bilan des hybridations *Nv* et CMS *G*.
(¹Saumitou *et al.* 1993; ²Cuguen *et al.* 1994)

Dix mutations ont été trouvées dans les 622 nucléotides codant du gène *nad9* contre seulement une dans les 720 nucléotides codant de *cox2*. Les mutations dans le codon-STOP de *nad9* et la leucine²⁵³ de *cox2* sont responsables du changement de taille observée chez les polypeptides correspondant à ces gènes.

La mutation dans le codon-STOP de *nad9* entraîne l'apparition d'un site *EcoRI*, (**GAATTC**) chez *Gnad9-1*. A l'inverse, la mutation dans le leucine²⁵³ en codon-STOP chez *Gcox2* provoque la disparition d'un site de restriction *AsnI* (**ATTAAT**). Ces modifications peuvent être mises en évidence simplement par digestion des produits PCR de *nad9* ou *cox2* (exon 2) avec les enzymes correspondant.

Nous avons recherché la présence de ces deux mutations sur l'ensemble de la collection des 23 cytoplasmes de betteraves maritimes et cultivées du laboratoire. La présence du gène de fusion *Gnad9-1* (*nad9/atp9*) ainsi que celle du gène délété *Gnad9-2* ont aussi été recherchées par PCR avec les amorces spécifiques (Figure 17). L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 5 :

	PCR 5' <i>nad9</i> /3' <i>atp9</i>	PCR 5' <i>nad9</i> /3' <i>nad9</i>	<i>nad9</i> mutation codon-STOP	PCR <i>cox2</i> -exon2	<i>cox2</i> mutation leucine ²⁵³
CMS <i>G</i>	585 pb	637 pb	oui	467 pb	oui
Collection Cytoplasmes	Aucune Amplification	1027 pb	non	467 pb	non

Tableau 5 : Bilan des recherches des caractéristiques génomiques de la CMS *G* dans la collection des 23 cytoplasmes betteraves.

Ces résultats confirment que la structure de *Gnad9-1* et *Gnad9-2*, la présence de *grande-NAD9* et de *petit-COX2* (mutations codon-STOP) sont caractéristiques du

cytoplasme *G* puisque aucun des cytoplasmes de betteraves examinés ne possède ces modifications.

Aucune des modifications observées chez les gènes codant pour les sous-unités NAD9 et COX2 du cytoplasme *G* n'ont été observées dans les autres cytoplasmes de betteraves étudiés suggérant qu'elles soient ensemble caractéristiques de ce cytoplasme stérilisant.

3-Conclusions

L'expression protéique du génome mitochondrial du cytoplasme *G* présente un profil particulièrement original par rapport au profil connu du genre *Beta*.

Ce cytoplasme possède deux copies du gène *nad9* : *Gnad9-1* a une structure 3' chimérique et une extension en 3' de l'*orf* de 14 codons, *Gnad9-2* a son extrémité 3' codante partiellement délétée et ne semble pas exprimé.

Le gène *Gcox2* a ses extrémités 5' et 3' réarrangées par rapport à celui du cytoplasme fertile *Nv* et une mutation dans l'*orf* réduit la taille de celle-ci de 8 codons.

Les sous-unités NAD9 et COX2 comportent des modifications de séquence qui impliquent, entre autres, un changement de poids moléculaire observé en synthèse *in organello* et confirmé en Western-blot.

Afin de déterminer une implication possible des modifications de ces sous-unités dans un dysfonctionnement mitochondrial nous avons étudié l'impact qu'elles pouvaient avoir sur l'intégrité et le fonctionnement des complexes I et IV auxquels elles appartiennent.

TROISIÈME PARTIE :

**LA CHAÎNE RESPIRATOIRE
DU CYTOPLASME G**

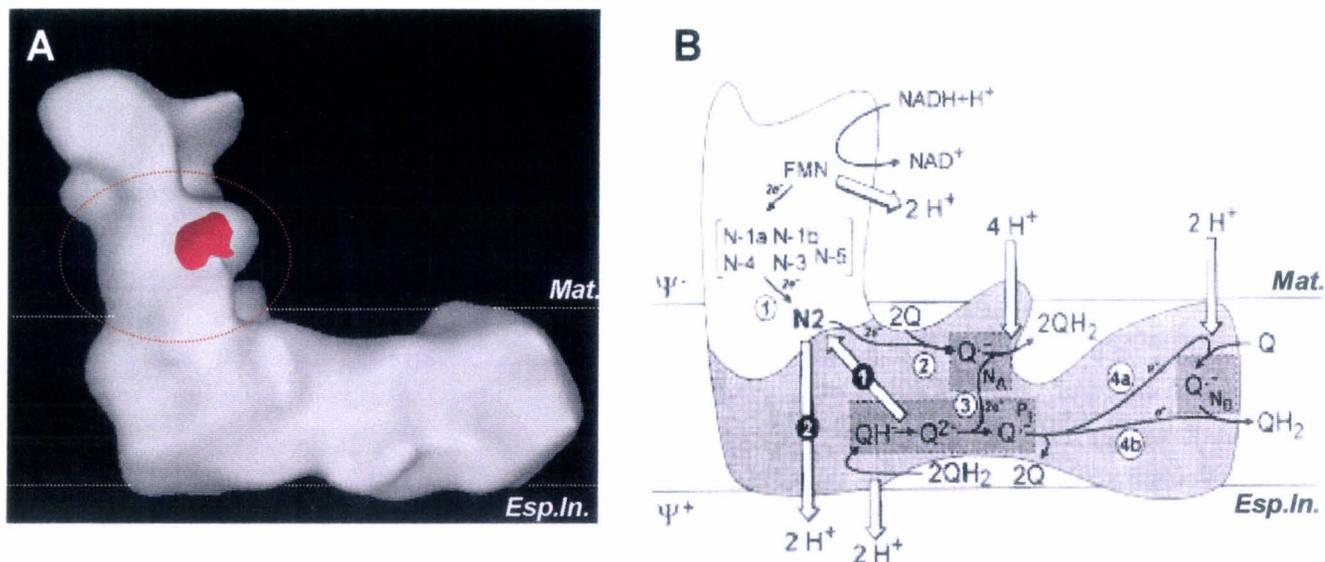


Figure 1 : Modèle structural et fonctionnel du complexe I. **A.** Profil obtenu par reconstitution tridimensionnelle du complexe I de *Neurospora crassa* d'après Guénebaut *et al.* (1997). Le cercle rouge indique la zone dans laquelle NAD9 est localisée. La marque rouge représente la taille relative de NAD9 par rapport au complexe I. **B.** Mécanismes réactionnels proposés par Brandt *et al.* (1997) représentant le parcours des électrons et des protons *via* les différents intermédiaires redox au cœur du complexe I. La partie grisée représente le bras membranaire, la partie blanche le bras matriciel. *Mat.*, matrice; *Esp.In.*, espace intermembranaire.

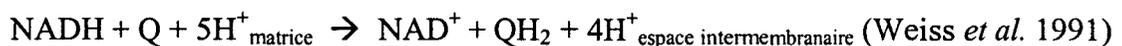
III – LA CHAÎNE RESPIRATOIRE DU CYTOPLASME G

1-Localisation et fonction de *grande-NAD9* et *petite-COX2*

1-1-NADH:ubiquinone oxydoréductase (Complexe I)

1-1-1-Structure et rôle du complexe I

Le complexe I, ou NADH:ubiquinone oxydoréductase est le premier complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale et bactérienne. Il est présent chez tous les eucaryotes à l'exception des levures et représente la première voie d'entrée des électrons dans la phosphorylation oxydative. Ce complexe a une structure en forme de "L" (Figure 1A). Un des bras est intégralement ancré dans la membrane mitochondriale interne (bras membranaire) et l'autre est situé dans la matrice (bras matriciel). Il catalyse l'oxydation du NADH matriciel produit par le cycle de Krebs. Cette réaction s'accompagne d'un transfert d'électrons vers l'ubiquinone (Q) ainsi que de la translocation de protons à travers la membrane mitochondriale interne vers l'espace intermembranaire. Le complexe I participe donc à l'établissement du gradient de protons utilisé par l'ATPsynthase pour la production d'ATP. Son activité peut-être spécifiquement inhibée par la roténone ou le myxothiazol, ce qui permet de distinguer son activité de celle des NAD(P)H déshydrogénases alternes présentes chez la plante (les champignons et les levures) et insensibles à ces inhibiteurs. Ces déshydrogénases alternes localisées de part et d'autre de la membrane interne peuvent court-circuiter le complexe I dans l'oxydation du NAD(P)H et le transfert d'électrons vers l'ubiquinone mais ne participent pas à la translocation de protons (Douce *et al.* 1973). L'activité du complexe I peut se traduire par :



Chez la plante, le complexe I est constitué d'au moins 32 sous-unités dont 9 sont codées par la mitochondrie (Combettes et Grienenberger 1999, Leterme et Boutry 1993, Unseld *et al.* 1997) : NAD1 à 7 (+ NAD4L) et NAD9. Le bras matriciel (Figure 1B) contient le premier centre accepteur d'électrons du NADH (FMN, flavine mononucléotide) ainsi que les centres fer-soufre (N-1a, N-1b, N4, N3, N5) impliqués dans le transfert des électrons vers les quinones (Q) du bras membranaire puis vers l'ubiquinone liposoluble. Le bras matriciel peut être décomposé en deux sous fragments, l'un contenant les

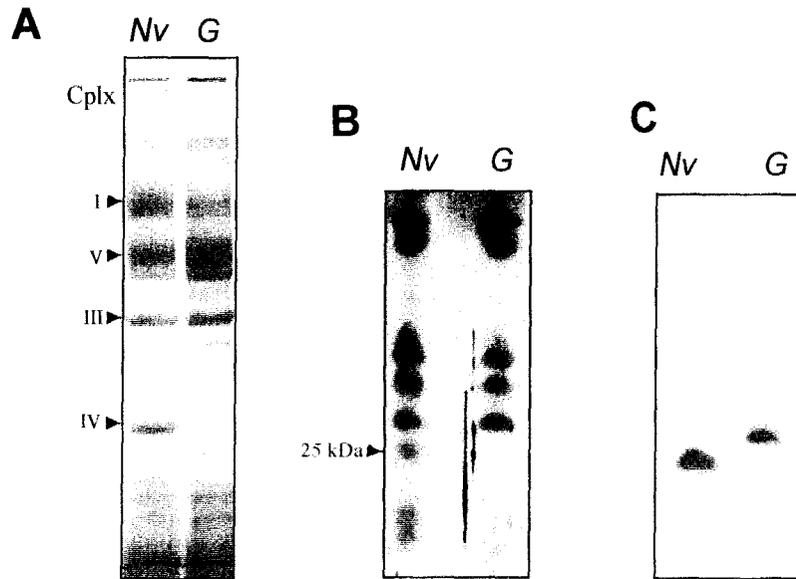


Figure 2 : Analyse des complexes mitochondriaux en bleu natif PAGE. **A.** Les complexes mitochondriaux (250 μ g) ont été solubilisés avec 1.5% de *n*-dodécylmaltoside, séparés en électrophorèse non dénaturante sur un gradient de polyacrylamide de 5-12% et les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie. Les flèches indiquent les complexes de la chaîne respiratoire. **B.** Les sous-unités du complexe I obtenues à partir d'un gel natif ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 15% et colorées au nitrate d'argent. **C.** Un gel identique à celui décrit en B a été analysé en Western-blot avec un anticorps anti-NAD9.

flavoprotéines et l'autre les centres fer-soufre. C'est dans ce dernier que la sous-unité de 30 kDa, l'homologue de NAD9 chez le bœuf, a été localisée (Walker 1992). Elle ne semble pas directement impliquée dans la constitution des centres fer-soufre et son rôle reste à ce jour inconnu.

1-1-2-Intégrité du complexe I dans la CMS *G*

Afin de déterminer si les changements en acides aminés ou l'extension C-terminale de *grande*-NAD9 pouvaient affecter la stabilité du complexe I de la CMS *G*, les fractions mitochondriales préparées à partir de feuilles de betterave fertile (*Nv*) et stérile (*G*) ont été séparées par électrophorèse non dénaturante (Figure 2A, bleu-natif PAGE). Les complexes de la chaîne respiratoire ont été identifiés dans un premier temps par comparaison du profil obtenu par la même méthode avec des mitochondries de pomme de terre (Jansch *et al.* 1996).

L'ensemble du profil obtenu avec *Nv* est similaire au profil obtenu sur *G*. Seule une bande correspondant probablement au complexe IV est clairement absente chez *G* (voir la suite § 1-2-2). La taille estimée du complexe I à 1000 kDa (le plus grand dans le gel) correspond certainement au complexe I intact, c'est à dire avec les bras membranaire et matriciel associés. Bien qu'une diminution de la bande correspondant au complexe I apparaissent chez *G* (Figure 2A), elle n'a pas été observée de manière reproductible. Nous pouvons donc conclure à ce sujet.

La séparation des sous-unités du complexe I en électrophorèse dénaturante (Figure 2B, SDS PAGE) montre en Western-blot avec un antisérum anti-NAD9 (Figure 2C) que la sous-unité modifiée *grande*-NAD9 est assemblée dans le complexe I de la CMS *G*. Ces modifications ne semblent donc pas gêner ni l'assemblage, ni la stabilité du complexe I, tout au moins dans les feuilles de betteraves.

1-1-3-Mesure de l'activité enzymatique du complexe I

L'activité du complexe I a été déterminée par deux méthodes. La première permet de mesurer directement l'oxydation du NADH en NAD⁺ (Leterme et Boutry 1993), la deuxième est une mesure de la réduction du cytochrome *c* par le complexe III alimenté par un flux d'électrons issus de l'oxydation du NADH en amont de la chaîne respiratoire (Mannella 1987).

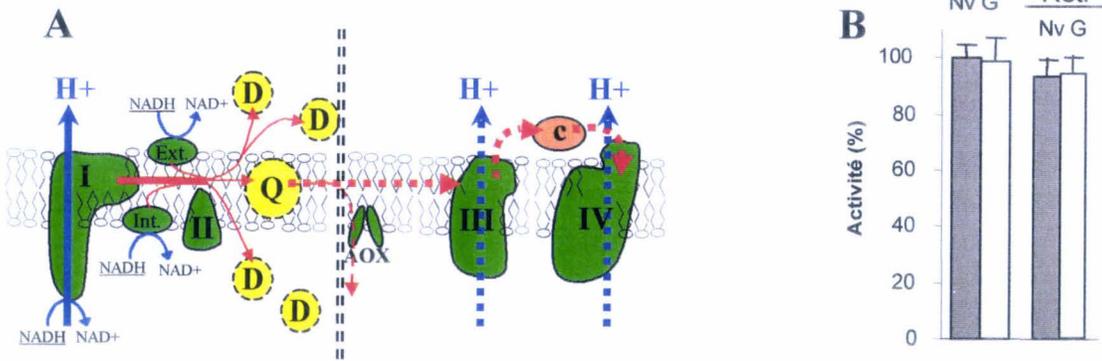


Figure 3 : Mesure de l'activité NADH déshydrogénase par mesure de la variation d'absorbance du NADH oxydé en NAD^+ à 340 nm avec des particules sub-mitochondriales (voir texte). **A.** Principe du dosage. Les flèches rouges représentent le parcours des électrons et les bleues, les translocations de protons. Les parcours en pointillés ne sont pas sollicités. **Ext.** et **Int.**, NADH déshydrogénases externes et internes; **AOX**, oxydase alternative; **(D)**, duroquinone exogène (**Q**), ubiquinone native. **B.** Activités enzymatiques des NADH déshydrogénases déterminées avec et sans roténone (Rot.). Activité 100% = $0.55 \pm 0.052 \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$.

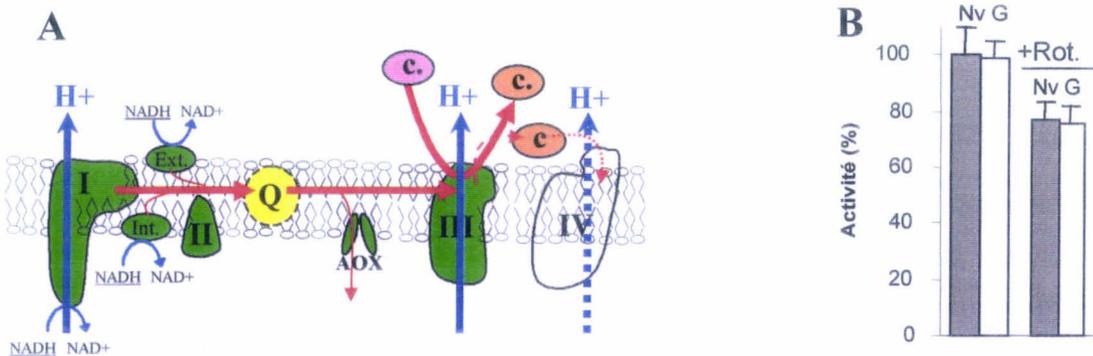


Figure 4 : Mesure de l'activité NADH déshydrogénase par mesure de la variation d'absorbance à 550 nm due à la réduction du Cyt. *c* avec des particules sub-mitochondriales (voir texte). **A.** Principe du dosage. Les flèches rouges représentent le parcours des électrons et les bleues, les translocations de protons. Les parcours en pointillés ne sont pas sollicités. Les abréviations utilisées sont les mêmes qu'en figure 3. **(c.)**, cytochrome *c* exogène oxydé (rose) ou réduit (orange). **B.** Activités enzymatiques des NADH déshydrogénases déterminées avec et sans roténone (Rot.). Activité 100% = $0.28 \pm 0.036 \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$.

La première méthode (Figure 3A) utilise la duroquinone (D) en excès comme accepteur exogène d'électrons à la place de l'ubiquinone (Q) native. Cette méthode court-circuite l'alternative oxydase (AOX), ainsi que les complexes II, III et IV. Le NADH utilisé comme substrat est oxydé par le complexe I et les déshydrogénases alternes (internes et externes). La variation d'absorbance à 340 nm mesurée pendant la réaction permet de calculer l'activité NADH déshydrogénase. L'EDTA présent dans le milieu réactionnel chélate les ions divalents du milieu comme le calcium (Ca^{2+}) susceptibles d'activer certaines déshydrogénases externes.

L'utilisation de la roténone comme inhibiteur spécifique du complexe I est extrêmement efficace chez les mammifères mais beaucoup moins chez la plante (Palmer et Ward 1985). L'inhibition du complexe I s'avère aussi dépendante du substrat respiratoire utilisé (Gutierrez *et al.* 1997) et du tissu analysé (Rasmusson *et al.* 1998). Ainsi, si on compare l'inhibition de la respiration par la roténone d'environ 25-30% obtenue avec des mitochondries de feuilles de tabac et le NADH comme substrat, l'inhibition de 5-7% observée chez la betterave est certainement partielle (Figure 3B). Cette faible inhibition peut être attribuée à plusieurs facteurs.

- (i) Le complexe I a perdu de son intégrité et par conséquent participe peu à l'oxydation du NADH.
- (ii) L'utilisation d'un accepteur d'électrons exogène comme la duroquinone favorise peut-être la voie des NADH internes et/ou externes.
- (iii) L'utilisation de détergents (DDM 0,05%) peut affecter la sensibilité à l'inhibiteur.

A partir de ces résultats, il est difficile d'attribuer au complexe I sa part de l'activité NADH déshydrogénase. C'est pourquoi nous avons utilisé une deuxième méthode de dosage en conservant cette fois-ci l'ubiquinone native comme accepteur d'électrons.

La deuxième méthode consiste en la mesure de la variation d'absorbance due à la réduction du cytochrome *c* (oxydé) exogène par le complexe III. Le flux d'électrons est alimenté par l'oxydation du NADH utilisé comme substrat. Le complexe II n'est pas sollicité (pas de succinate) et le complexe IV est inhibé par du cyanure afin d'éviter la réoxydation du cytochrome *c* réduit. Le milieu réactionnel contient aussi de l'EDTA.

Nous avons obtenu une inhibition par la roténone d'environ 25% pour les deux cytoplasmes. Bien qu'elle soit encore certainement partielle, ces résultats semblent indiquer

d'une part qu'il n'y a pas de différence notable entre l'activité globale des NADH déshydrogénases et d'autre part que la part prise par le complexe I dans l'oxydation du NADH paraît relativement proche entre les deux cytoplasmes dans ces expériences.

1-1-4-Conclusions

L'analyse génomique de la sous-unité 9 du complexe I (*nad9*) a révélé de nombreuses modifications de séquence entre les cytoplasmes fertile (*Nv*) et stérile (*G*).

L'étude du complexe I de la CMS *G* a révélé que son intégrité semblait conservée et que la sous-unité NAD9 modifiée était assemblée. Compte tenu des conditions expérimentales, les dosages d'activité NADH déshydrogénases *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence de différence d'activité entre le complexe I des cytoplasmes stérile et fertile mais nous n'avons aucune indication quant à l'efficacité de la translocation des protons.

La composition du complexe I est extrêmement variable d'une espèce à l'autre. On dénombre 41 sous-unités dans la mitochondrie de bœuf (Fearnley et Walker 1992), 32 chez la plante (Leterme et Boutry 1993, Rasmusson *et al.* 1994) et seulement 14 chez les bactéries (Friedrich *et al.* 1995). NAD9 fait partie des onze sous-unités conservées dans le complexe I mitochondrial et bactérien qui constituent le complexe minimal fonctionnel (Friedrich et Scheide 2000). Bien que la fonction de la sous-unité NAD9 n'ait pas encore été déterminée, sa conservation semble indiquer qu'elle est nécessaire au fonctionnement ou à l'intégrité du complexe I. En effet, chez le champignon *Neurospora crassa*, NUO30.4 l'homologue de NAD9, est codée par le noyau. Son inactivation aboutit à la désintégration du bras matriciel ce qui semblerait indiquer que cette sous-unité puisse être impliquée dans l'assemblage ou la stabilité du bras matriciel (Duarte *et al.* 1998). Enfin, Yamagushi *et al.* (2000) ont montré récemment chez le bœuf que les sous-unités de 51 kDa et 30 kDa (55 kDa et NAD9 chez la plante) pouvaient être marquées par photoaffinité avec du NADH, NADPH et de l'ADP modifiés, marqués au P³². La sous-unité de 51 kDa contient le site de fixation du NADH (Deng *et al.* 1990) et ces résultats suggèrent que des résidus aminés de NAD9 pourraient être également impliqués dans la liaison du NADH avec le complexe I.

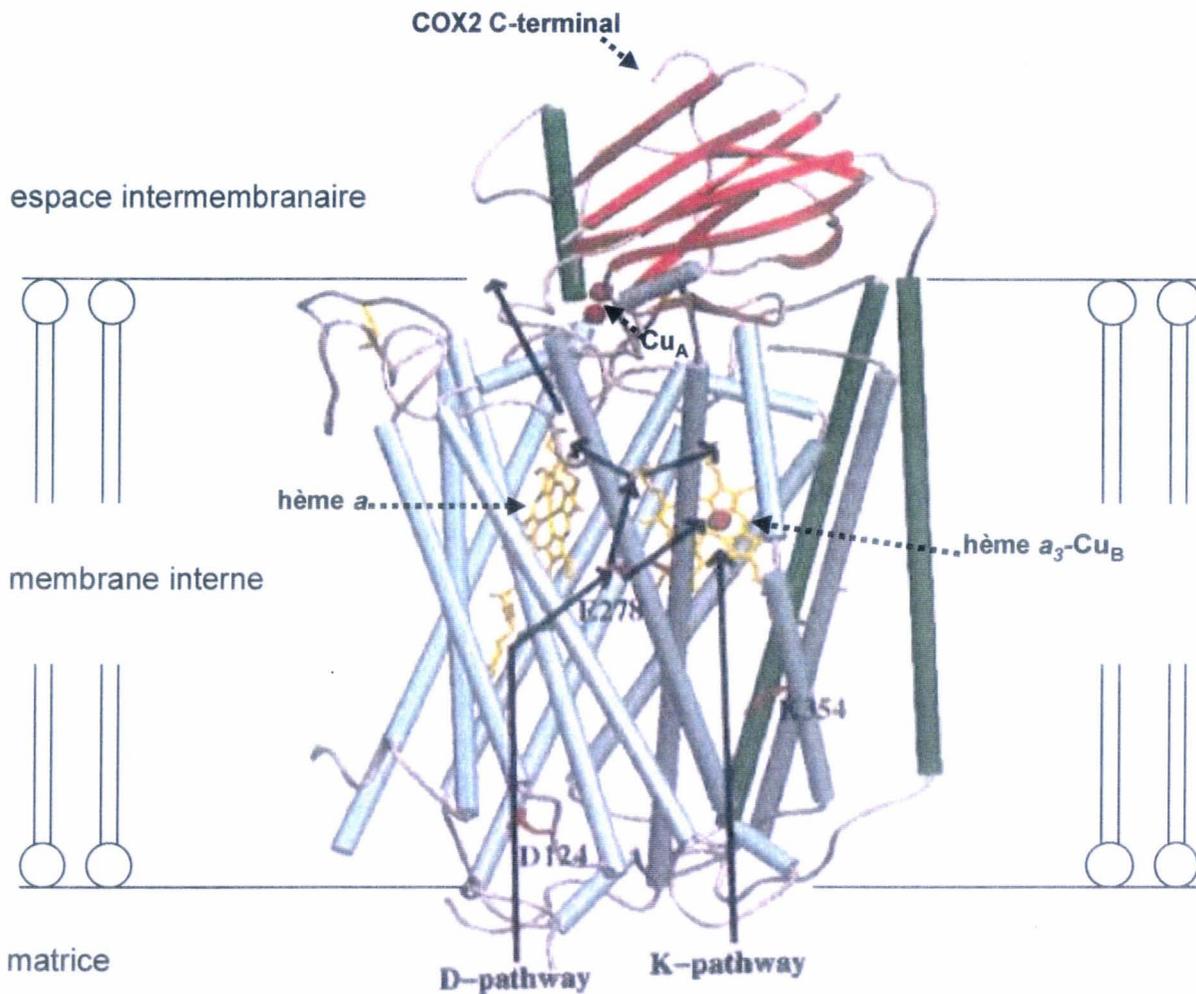


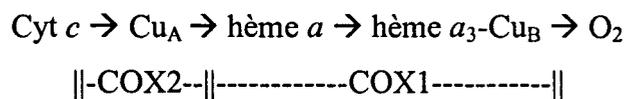
Figure 5 : Structure du cœur réactionnel COX1/COX2 de la cytochrome *c* oxydase de bœuf d'après Hartmut (1998). La sous-unité COX1 est en bleu et gris, COX2 est en vert (membranaire) et rouge (espace intermembranaire). Les flèches en pointillés indiquent la position des centres cuivre Cu_A et Cu_B (points rouges), des hèmes *a* et *a*₃ (jaune) et du C-terminal de COX2. Les voies possibles de transfert de protons (D-pathway et K-pathway) sont représentées par des flèches pleines noires.

1-2-Cytochrome *c* oxydase (Complexe IV)

1-2-1-Structure et fonctionnement du complexe IV

Le complexe IV, ou cytochrome *c* oxydase, est l'accepteur final de la chaîne respiratoire et transfère les électrons du cytochrome *c* vers l'oxygène moléculaire de la matrice. Ce transfert s'accompagne de la translocation de 2 protons vers l'espace intermembranaire. Ce complexe est composé de 3-4 sous-unités chez les bactéries aérobies et d'au moins 13 chez les mammifères.

Chez la plante, on dénombre 10 sous-unités (Jansch *et al.* 1996, Peiffer *et al.* 1990). Les sous-unités COX1, COX2 et COX3 constituent le noyau de l'enzyme que l'on retrouve chez les bactéries et sont codées par la mitochondrie à l'exception des légumineuses où COX2 est nucléaire (Nugent et Palmer 1991). COX1 et COX3 sont intégrées dans la membrane interne mitochondriale. COX2 est ancrée dans la membrane par deux hélices trans-membranaires mais la majeure partie de cette sous-unité est localisée dans l'espace intermembranaire. Les sous-unités 1 et 2 constituent le centre réactionnel de la cytochrome *c* oxydase où s'effectuent le transfert d'électrons et la translocation de protons (Figure 5) (Hartmut 1998, Tsukihara *et al.* 1996). COX2 possède le site de fixation du substrat (cytochrome *c*) et un centre cuivre (Cu_A) qui est le premier accepteur d'électrons de l'enzyme. Le transfert d'électrons s'effectue ensuite vers COX1 par l'hème *a*, puis l'hème *a*₃ couplé au deuxième centre cuivre (Cu_B), jusqu'à l'oxygène moléculaire (O₂), l'accepteur final de la chaîne respiratoire. Le transfert d'électrons dans la cytochrome *c* oxydase peut se résumer par :



Les mécanismes de translocation des protons à travers la membrane interne mitochondriale par la cytochrome *c* oxydase ne sont pas complètement élucidés. Toutefois, deux canaux membranaires, D et K, ont clairement été identifiés dans la structure tridimensionnelle de ce complexe (Figure 5). Le canal D, exclusivement constitué par COX1, semble essentiellement être impliqué dans la translocation des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire mais Hartmut (1998) suggère qu'il puisse aussi alimenter l'hème *a*₃-Cu_B. Le canal K, constitué par des hélices membranaires de COX1 et

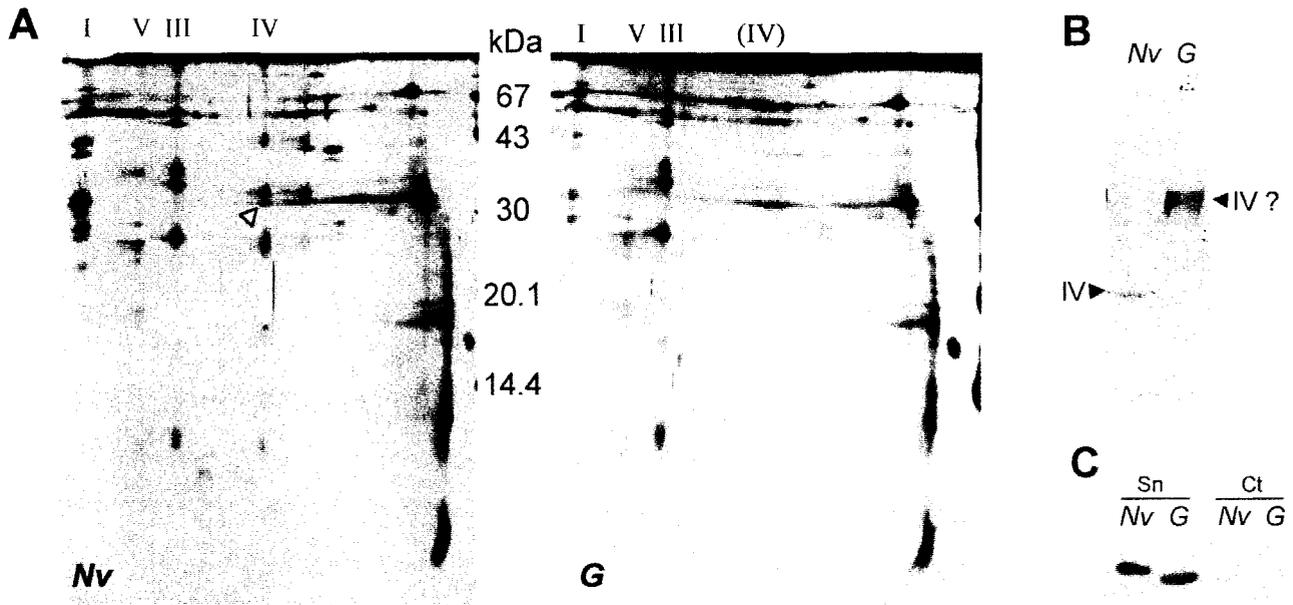
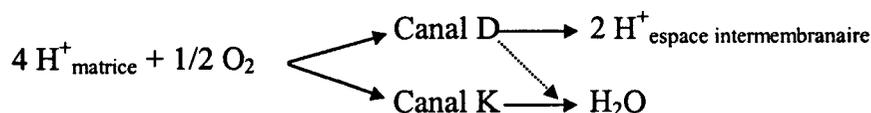


Figure 6 :Identification du complexe absent de la CMS *G* en bleu-natif PAGE. **A.** Séparation des sous-unités des complexes mitochondriaux (150 μ g de membranes mitochondriales) en électrophorèse SDS-PAGE 15% après bleu-natif PAGE (gels colorés au nitrate d'argent). La flèche blanche sur *Nv* indique la position d'une sous-unité de 32 kDa dont le N-terminal a été micro-séquencé à partir d'un gel identique à celui-ci transféré sur membrane. **B.** Western-blot avec un anti-sérum anti-COX2 sur un gel bleu-natif transféré sur une membrane avec 20 μ g de protéines par puits. **C.** Western-blot anti-COX2 sur des fractions mitochondriales solubilisées avec 1.5% de DDM, ultracentrifugées puis séparées en SDS-PAGE. Sn, surnageant; Ct, culot.

COX2, serait impliqué dans la réduction de l'O₂ moléculaire en H₂O via l'hème a₃-Cu_B. Les mouvements de protons peuvent se résumer par :



La sous-unité COX2 participe donc activement aux deux fonctions enzymatiques du complexe IV : le transfert d'électrons du cytochrome *c* vers l'O₂ et l'établissement du gradient électrochimique dans la mitochondrie par translocation de protons à travers la membrane interne. Cette sous-unité est essentielle pour ce complexe dont les altérations ont souvent des conséquences sévères sur le développement des organismes et des plantes en particulier (voir Introduction, § 4-4).

1-2-2-Intégrité du complexe IV dans la CMS *G*

L'analyse de la séquence génomique de la sous-unité COX2 du cytoplasme stérile *G* a montré qu'elle était tronquée des huit acides aminés de son C-terminal. Cette partie est très conservée chez les dicotylédones et en particulier la leucine²⁵³ est conservée chez les végétaux (§ II-2-2-2). Bien que ces huit acides aminés ne semblent pas directement impliqués dans les transferts de protons ou d'électrons, leur conservation suggère qu'ils puissent être nécessaires pour assurer le bon fonctionnement du complexe.

L'électrophorèse non-dénaturante (bleu natif PAGE) de complexes mitochondriaux présentée dans un paragraphe précédent (§1-1-2 et figure 2A) montre clairement l'absence d'une bande dans la ligne correspondant à la CMS *G*. Cette bande avait été associée au complexe IV par comparaison avec le profil obtenu avec des mitochondries de pomme de terre. L'identité du complexe IV a été confirmée par la séparation des sous-unités des complexes en électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) et le microséquençage N-terminal d'une sous-unité de 32 kDa de ce complexe dans le cytoplasme *Nv* (Figure 6A). La séquence peptidique obtenue (DAAEPWQLGF) correspond à la séquence du N-terminal de la forme mature de COX2 de la betterave (Mann *et al.* 1991). Bien que les sous-unités des complexes I et V soient mal résolues sur la deuxième dimension dénaturante, celles du complexe III apparaissent clairement dans les deux cytoplasmes alors que celles correspondant au complexe IV sont absentes chez *G*. Le Western-blot réalisé avec un anti-sérum anti-COX2 sur les complexes mitochondriaux séparés en gel natif montre une bande correspondant à la cytochrome *c* oxydase chez *Nv* et un signal difficilement interprétable

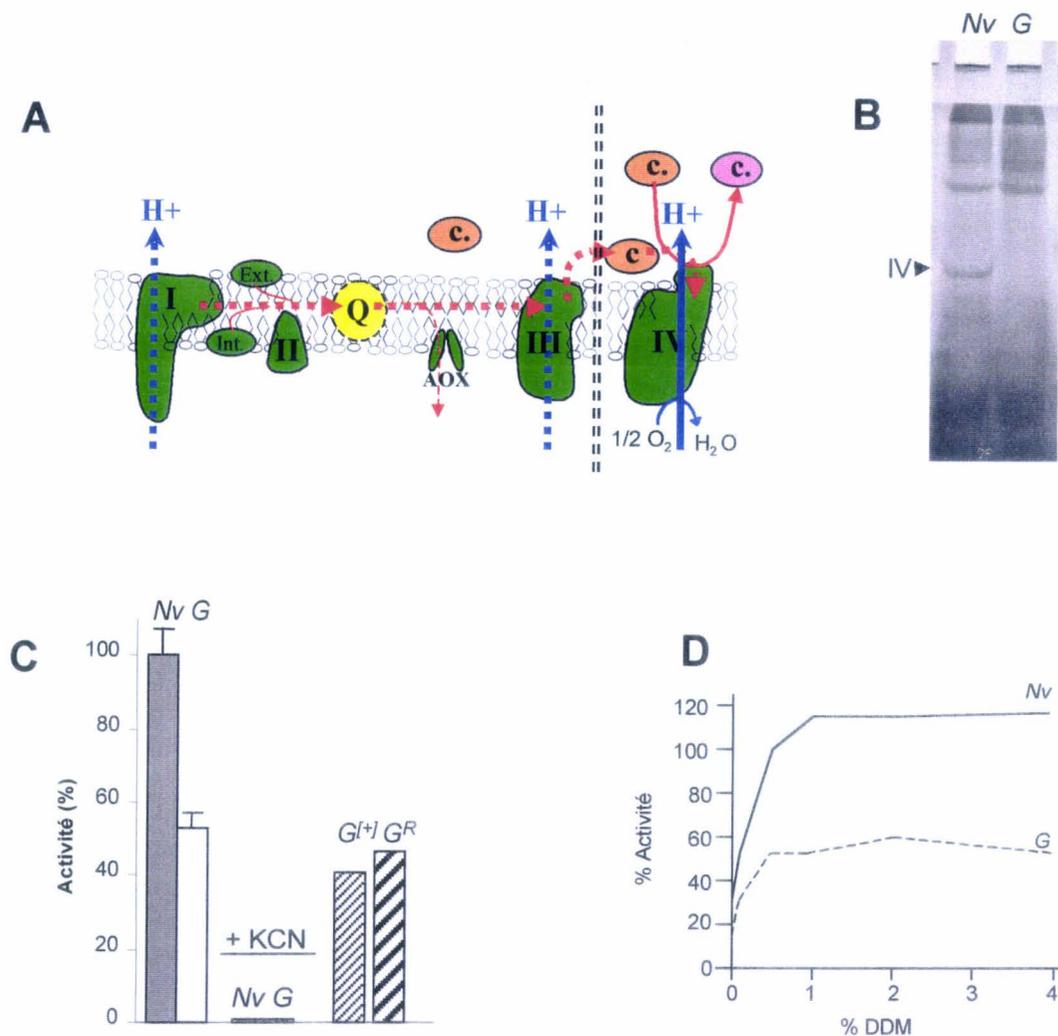


Figure 7 : Mesures de l'activité cytochrome *c* oxydase. **A**. Principe du dosage par mesure de la variation d'absorbance à 550 nm due à l'oxydation Cyt. *c* exogène (*c.*) (voir texte). Les flèches rouges représentent le parcours des électrons et les bleues, les translocations de protons. Les parcours en pointillés ne sont pas sollicités. **B**. Electrophorèse en gel bleu-natif (6%-13% d'acrylamide, sans coloration) des protéines des particules sub-mitochondriales (100 µg) obtenues après sonication. **C**. Activité cytochrome *c* oxydase de particules sub-mitochondriales préparées avec les cytoplastes : *Nv* et *G* avec et sans KCN; $G^{[+]}$, CMS *G* sur betterave maritime (sauvage); G^R , CMS *G* plante restaurée. Activité 100% = 2.7 ± 0.19 µmol/min/µg. **D**. Dosage l'activité cytochrome *c* oxydase en présence de différentes concentrations de *n*-dodécylmaltoside (DDM).

pour la CMS *G* (Figure 6B). Enfin, le test de solubilisation au *n*-dodécylmaltoside, le détergent utilisé avant l'électrophorèse en gel bleu-natif, indique que dans les deux cytoplasmes la sous-unité COX2 est solubilisée puisqu'elle se retrouve dans le surnageant (Figure 6C). Par conséquent, l'absence du complexe IV en gel natif dans le cytoplasme *G* n'est pas liée à un problème de solubilisation de l'échantillon et sa localisation dans le gel reste énigmatique. Peut-être ne pénètre-t-il pas dans le gel et précipite dans le puits ou bien, dissocié pendant l'électrophorèse, les sous-unités de petites tailles comme COX2, migrent avec le front de migration. Le signal observé dans la figure 6B pourrait correspondre au complexe agrégé, en cours de désintégration pendant la migration.

Mis à part la stérilité mâle, les plantes portant le cytoplasme *G* ne présentent aucune autre altération phénotypique. Bien que le complexe IV ne soit pas résolu en électrophorèse native, il est difficile d'imaginer que ces plantes peuvent se développer normalement en l'absence totale de complexe IV. Ce complexe est donc probablement présent aussi chez *G* mais moins stable, peut-être fragilisé par une sous-unité COX2 tronquée, il migre mal ou se désintègre dans les conditions expérimentales de l'électrophorèse native.

1-2-3-Mesure de l'activité enzymatique du complexe IV

L'activité du complexe IV est déterminée en mesurant la variation d'absorbance du cytochrome *c* lorsqu'il passe de l'état réduit à l'état oxydé par l'intermédiaire de la cytochrome *c* oxydase. Le substrat est du cytochrome *c* exogène commercial de cheval réduit avec de la dithionite. Seul le complexe IV est sollicité dans la réaction d'oxydation (Figure 7A). La réaction est effectuée en présence de 0.5% de DDM.

L'intégrité du complexe IV dans les particules sous-mitochondriales, tout au moins pour *Nv*, a été contrôlée en gel natif (Figure 7B).

Le dosage de l'activité cytochrome *c* oxydase a révélé une diminution d'activité d'environ 50% (48.2%) dans le cytoplasme stérile *G* par rapport au fertile *Nv* (Figure 7C, gauche). Dans les deux cas, nous avons obtenu une inhibition totale de l'activité par le cyanure (KCN, 1 mM), un inhibiteur spécifique du complexe IV, ce qui permet d'attribuer l'activité résiduelle mesurée chez *G* à ce complexe.

Afin de contrôler que la différence d'activité observée n'était pas due à un effet d'alloplasmie engendré par la substitution du cytoplasme de la betterave cultivée (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) par celui de la betterave maritime (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*),

nous avons procédé à un test d'activité avec des particules sub-mitochondriales préparées à partir de feuilles d'une betterave maritime stérile portant le cytoplasme *G*. La différence obtenue est sensiblement la même, suggérant que la différence d'activité soit probablement liée directement au cytoplasme *G* (Figure 7C, droite $G^{+/}$) et non à une incompatibilité des sous-unités nucléaires COX des betteraves cultivées avec celles du cytoplasme d'origine sauvage. Rappelons ici, que sur l'ensemble des cytoplasmes de betteraves maritimes testés seule la CMS *G* possède un COX2 tronqué (Partie II, §2-3).

D'autre part une mesure d'activité a été effectuée avec des mitochondries préparées à partir de feuilles d'une betterave maritime portant le cytoplasme *G* avec une fertilité mâle restaurée. La même diminution d'activité d'environ 50% a ici aussi été mise en évidence (Figure 7C, droite G^R). La restauration de la CMS *G* n'est donc pas directement liée à une reprise normale de l'activité cytochrome *c* oxydase dans les feuilles.

Enfin, des mesures d'activité réalisées à différentes concentrations de *n*-dodécyl-maltoside (DDM) montrent que l'activité cytochrome *c* oxydase persiste au-delà de 4% de détergent dans le milieu réactionnel avec des particules sub-mitochondriales. Ceci indique que la présence de 1.5% de DDM dans le tampon de solubilisation de protéine du gel bleu-natif, n'est pas responsable de la déstabilisation éventuelle du complexe pendant l'électrophorèse. L'activité optimale semble située autour de 1% de détergent pour les deux cytoplasmes (figure 7D).

Bien qu'aucun signal n'ait pu être clairement attribué au complexe IV en électrophorèse native chez *G*, les mesures d'activité confirment la présence du complexe IV actif dans ce cytoplasme avec une activité mesurée réduite d'environ 50%.

1-2-4-Conclusions

Nous avons montré que la CMS *G* possède une COX2 tronquée et que cette modification est spécifique à ce cytoplasme. Par ailleurs, les propriétés électrophorétiques et l'activité du complexe IV sont aussi modifiées dans ce cytoplasme stérilisant mais il est difficile à ce stade d'établir un lien entre ces différentes observations.

La perte des 8 acides aminés du C-terminal de COX2 peut avoir des conséquences sur l'export des extrémités N- et C-terminales de cette sous-unité à travers la membrane mitochondriale interne. Chez la levure, COX2 est aussi synthétisée sous la forme d'un précurseur mûré par clivage du N-terminal. Herrmann *et al* (1995) montrent que la translocation du N-terminal et du C-terminal de préCOX2, puis sa maturation dépendent

du potentiel énergétique de la membrane et la nature hydrophile, globalement négative, des extrémités de ce polypeptide. Ils montrent aussi que ces phénomènes précèdent l'assemblage de COX2 dans le complexe IV et mettent en évidence la présence de COX2, maturée et structurée dans la membrane interne mais pas assemblée dans le complexe.

Les Western-blots réalisés sur les betterave stériles et fertiles ne révèlent pas de différences quantitatives notables entre COX2 et *petit*-COX2 ce qui semble indiquer que les modifications de séquences de *Gcox2* n'altèrent pas son expression ni sa maturation N-terminale. Par contre, nous n'avons aucune idée quant à la qualité de l'assemblage de cette sous-unité tronquée puisque le complexe IV n'a pas pu être isolé par électrophorèse non dénaturante. En conséquence, on ne peut pas exclure l'hypothèse que la réduction d'activité cytochrome *c* oxydase chez *G* puisse être due à une déficience partielle de l'assemblage de *petite*-COX2 impliquant une diminution de la quantité de complexes fonctionnels.

Nous avons vu que le C-terminal tronqué chez *petite*-COX2 n'est pas directement associé aux transferts de charges dans le complexe IV, mais qu'il est clairement localisé dans l'environnement du site de fixation du cytochrome *c* dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Figure 5). Un changement dans la composition en acide aminé de COX2 pourrait modifier la conformation de ce site et l'affinité de l'enzyme pour son substrat, diminuant ainsi sensiblement son activité.

Enfin, que ce soit à cause d'un problème d'assemblage ou d'affinité pour le substrat, la diminution de l'activité du complexe IV ainsi que son instabilité pourraient aussi être le résultat d'une mauvaise interaction entre *petite*-COX2 et les autres sous-unités natives du complexe.

La baisse d'activité du complexe IV pose un problème au niveau de la chaîne respiratoire et de la production d'énergie. Théoriquement, si l'oxydation du cytochrome *c* est ralentie de moitié, la translocation de protons couplée à la réaction d'oxydation serait aussi réduite de moitié, ce qui engendrerait une diminution du potentiel électrochimique de la membrane et donc une baisse de production d'ATP par l'ATP synthase mitochondriale. D'autre part, le flux d'électrons alimenté par les NADH déshydrogénases et les complexe I et II, véhiculé par le pool d'ubiquinone devrait arriver en saturation au niveau du cytochrome *c*. Mais ce flux peut aussi être en partie dévié vers l'oxydase alterne qui court-circuite les complexes III et IV. Nous avons donc estimé le taux d'expression de cette enzyme dans les cytoplasmes fertile et stérile afin de vérifier si cette voie était effectivement plus sollicitée chez *G*.

2-Particularités de la chaîne respiratoire du cytoplasme G

2-1-Oxydase alterne (AOX)

2-1-1-Fonction et génétique de l'AOX

L'oxydase alterne (ou AOX pour *Alternative OXydase*) a été révélée par l'existence d'une respiration insensible au cyanure chez les plantes, les champignons et les levures (revue Sluse et Jarmuszkiewicz 1998). En effet, l'inhibition de la voie du cytochrome *c* par l'antimycine A (complexe III) ou le cyanure (complexe IV) n'affecte pas l'activité de l'oxydase alterne. L'AOX transfère directement les électrons de l'ubiquinone à l'oxygène moléculaire (O₂) alors réduit en H₂O sans transférer de protons vers l'espace intermembranaire (Moore et Siedow 1991). Elle court-circuite les complexes III et IV et ne participe pas à la conservation d'énergie par la mise en place du gradient de protons. L'énergie est dissipée sous forme de chaleur (Moore *et al.* 1978).

Chez la plante, l'AOX est codée par une petite famille de gènes nucléaires. Trois gènes ont été identifiés chez le soja et leur expression est tissu-spécifique (Whelan *et al.* 1996). Chez *Arabidopsis thaliana*, 4 gènes ont été identifiés et caractérisés (AOX1a-c et AOX2). Alors que AOX1a et AOX1c sont transcrits dans tous les organes de la plante, AOX1b est exprimé dans les tissus floraux et AOX2 dans la tige, les feuilles et les racines (Saisho *et al.* 1997).

L'induction de l'AOX est aussi associée à différents stress comme le froid, les blessures, une attaque par un pathogène, à la production d'éthylène, la maturation des fruits, la sénescence (McIntosh 1994). La grande variété de stress induisant l'expression de l'AOX rend difficile la compréhension de sa régulation et sa fonction exacte dans la plante.

Enfin, l'AOX a une structure dimérique et le degré d'oxydation d'un pont di-sulfure qui relie les deux monomères entre eux permet aussi de réguler son activité. La forme oxydée (avec pont) est peu active et la forme réduite (sans pont) est la plus active (Umbach et Siedow 1993).

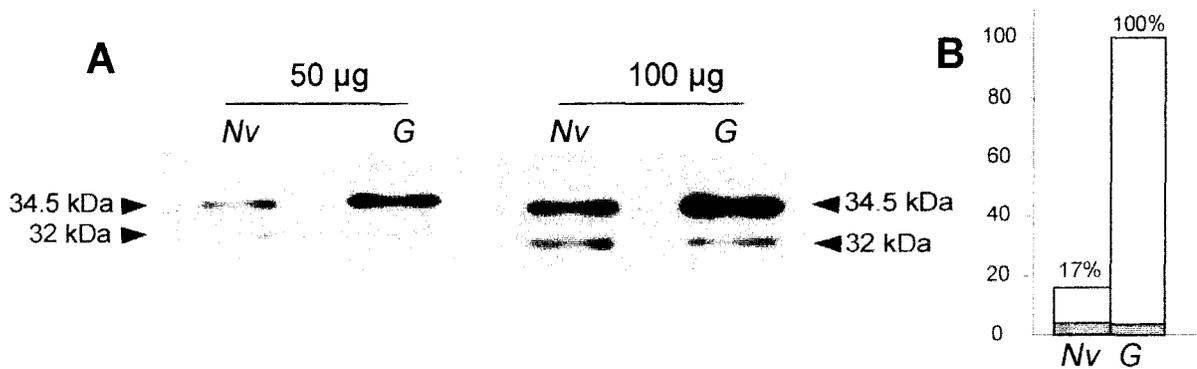


Figure 8 : Quantification de l'expression de l'AOX. **A.** Western-blot réalisé avec un anticorps monoclonal anti-AOX sur 50 ou 100 µg de protéines mitochondriales extraites de feuilles de plantes portant le cytoplasme *Nv* ou *G*. Les tailles des différentes sous-unités sont indiquées par les pointes de flèches. **B.** Quantification par densitométrie des différentes bandes AOX révélées en Western Blot; gris, sous-unité de 32 kDa; blanc, sous-unité de 34.5 kDa (moyenne sur deux expériences).

2-1-2-Niveau d'expression de l'AOX dans le cytoplasme *G*

Etant donné l'activité réduite de la cytochrome *c* oxydase dans le cytoplasme *G*, nous avons estimé le niveau d'expression de l'AOX en tant qu'accepteur alternatif des électrons de l'ubiquinone.

Le Western-blot réalisé avec un anticorps monoclonal anti-AOX sur un extrait de protéines mitochondriales de feuilles de plantes fertile et stérile, révèle la présence dans les deux cytoplasmes de deux sous-unités de 32 et 34.5 kDa (Figure 8A). Ces deux sous-unités semblent être exprimées de façon constitutive dans les feuilles de betterave. La présence de deux sous-unités AOX dans les tissus végétatifs a déjà été rapportée chez d'autres espèces comme le soja (Whelan *et al.* 1996). L'intensité du signal correspondant à la sous-unité de 32 kDa est relativement proche dans les deux cytoplasmes. Par contre, on constate que chez la plante stérile, le signal correspondant à la sous-unité de 34.5 kDa est plus fort que chez la fertile. L'intensité des bandes AOX (32 et 34.5 kDa) additionnées (estimé par densitométrie, OneD-Scan) donne un rapport entre *Nv* et *G* de 6 (Figure 8B). Dans les feuilles, l'AOX est essentiellement présente sous forme réduite, active (Vanlerberghe *et al.* 1999) et, bien que ces résultats ne donnent pas d'indication directe sur l'activité de l'oxydase alterne, chez toutes les espèces végétales analysées, le potentiel d'activité de l'AOX est proportionnel à la quantité de protéine détectable en Western-blot (Elthon *et al.* 1989b, Vanlerberghe et McIntosh 1994). La sur-expression de cette protéine et son activité potentielle associée restent cohérentes avec l'idée que chez la plante stérile (*G*), une partie plus importante du flux d'électrons est déviée vers l'AOX pour compenser la déficience de la cytochrome *c* oxydase.

2-1-3-Bilan énergétique du cytoplasme *G*

L'ensemble des modifications décrites sur les plantes portant le cytoplasme *G* ont été observées sur des mitochondries préparées à partir de feuilles de betteraves et elles sont compatibles avec le développement normal de la plante. Par ailleurs, la respiration insensible au cyanure, relative à l'activité AOX, est extrêmement variable d'une espèce végétale à l'autre et selon le substrat respiratoire (voir Tableau 1). Le degré d'engagement de l'AOX dans les feuilles dépend aussi de l'âge de celles-ci et peut atteindre un maximum de 28% de la respiration totale par exemple dans les feuilles de blé âgées de 14 jours contre 5% dans d'autres phases du développement (Lennon *et al.* 1995). On peut donc supposer

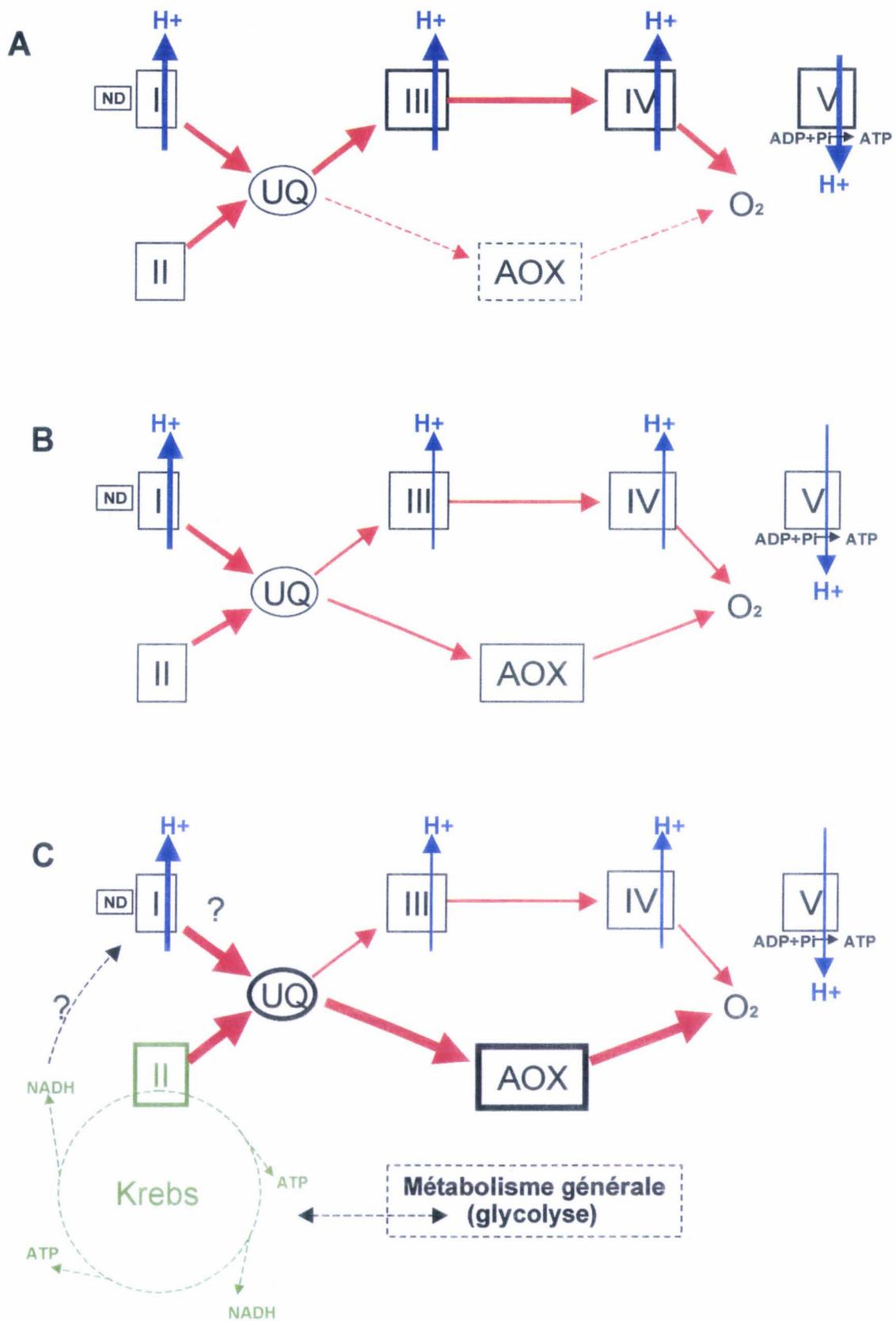


Figure 9 : Schéma représentant la répartition des électrons (flèches rouges) entre la voie du cytochrome *c* ou l'AOX. Les complexes respiratoires sont symbolisés par des carrés numérotés. Les translocations de protons (flèches bleues) et la production associée d'ATP par l'ATP synthase (V) sont indiquées. UQ, pool d'ubiquinone; ND, NAD(P)H déshydrogénases alternes. **A.** Schéma pour *Nv*, activité AOX résiduelle. **B.** Schéma pour *G*, AOX sur-exprimée pour compenser la déficience du complexe IV. **C.** Sur-expression de l'AOX en réponse à la déficience du complexe IV et l'activation du cycle de Krebs.

que la sur-expression de l'AOX chez *G* ne reflète pas une réponse à un réel stress physiologique mais plutôt une adaptation naturelle du métabolisme cellulaire pour compenser la déficience du complexe IV. Le niveau d'expression d'AOX révélé dans les mitochondries de feuilles des betteraves portant le cytoplasme "normal" *Nv* correspond au niveau résiduel d'AOX pour des jeunes feuilles de betteraves âgées de 6 à 8 semaines.

Espèce végétale	Pourcentage d'inhibition par KCN		
	malate	succinate	NADH
<i>Arum maculatum</i>	5-56	0-55	30-55
<i>Symplocarpus foetidus</i>	25-45	17-50	17-50
<i>Sauromatym guttatum</i>	51	0-52	55
<i>Zea mays</i>	10-75	80-100	86-100
<i>Triticum aestivum</i>	81	78	96
<i>Solanum tuberosum</i>	78-94	86-99	86-99
<i>Helianthus tuberosum</i>	95	95-98	97

Tableau 1 : Respiration résistante au cyanure : variation avec le substrat respiratoire (d'après Lance *et al.* 1985).

De façon simplifiée, théoriquement chez une plante non stressée, l'activité AOX (respiration insensible au cyanure) est résiduelle et le flux d'électrons véhiculé par l'ubiquinone (UQ) est dirigé vers la voie du cytochrome *c* sur les complexes III et IV (voie classique) jusqu'à l'O₂ moléculaire. Ce transfert s'accompagne de translocation de protons vers l'espace intermembranaire. L'ATP synthase (C_v) utilise la force proto-motrice générée pour produire de l'ATP en transférant les protons vers la matrice (Figure 9A).

Chez la CMS *G* nous avons montré que l'activité du complexe IV est ralentie de moitié *in vitro* et que la répartition des électrons étaient certainement modifiée au profit de l'AOX sur-exprimée. Ce dernier changement affecte aussi théoriquement l'activité du complexe III. Finalement la translocation de protons par la voie du cytochrome *c* (complexe III et IV) est globalement diminuée et en conséquence la production d'ATP ralentie (Figure 9B). Puisque le cytoplasme *G* n'affecte que le développement du pollen, outre le fait que la déficience de la cytochrome *c* oxydase puisse être compensée par l'oxydase alterne, d'autres voies métaboliques que la chaîne respiratoire sont certainement sollicitées pour la production d'énergie afin de rétablir un bilan énergétique compatible avec le développement normal de la plante. La phosphorylation oxydative, la glycolyse et le cycle de Krebs sont deux autres voies de production d'énergie dans la cellule. Une augmentation de l'activité de ces deux voies est un moyen de produire plus d'énergie. L'élévation de l'activité du cycle de Krebs implique aussi une augmentation de l'activité du

complexe II (succinate désydrogénase), un intermédiaire de ce cycle (Figure 9C). Le complexe II ne participe pas au gradient de protons mais il alimente le flux d'électrons de la chaîne respiratoire. Dans l'hypothèse où le cycle de Krebs serait plus sollicité chez *G*, on peut alors imaginer que le niveau de sur-expression de l'AOX traduit aussi une réponse au flux d'électrons sur-alimenté par le complexe II.

Enfin, le pyruvate qui est un précurseur de l'acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs, permet aussi de réguler l'activité de l'AOX en agissant comme activateur allostérique (Vanlerberghe *et al.* 1995). La relation étroite entre la régulation de l'activité AOX, le complexe II et le cycle de Krebs suggère que l'activité de ce dernier soit modifiée/adaptée chez la CMS *G*, et par extension l'ensemble de son métabolisme cellulaire.

Remarque: L'activité NADH désydrogénase mesurée par la méthode 2 (réduction du cytochrome *c* exogène, § 1-1-3) fait intervenir l'activité du complexe III qui peut-être modifiée chez *G* par l'augmentation de l'activité AOX. Il est donc difficile à partir de ces données d'estimer l'activité du complexe I chez *G*.

2-2-Avantages potentiels du cytoplasme *G*

Malgré des modifications métaboliques importantes, la CMS *G* est maintenue en milieu naturel, parfois avec une fréquence élevée dans certaines populations. En conséquence, mis à part la stérilité mâle, ces modifications n'altèrent pas le développement de la plante et sont compatibles avec sa survie sous la pression de la sélection naturelle. Nous avons vu que le maintien d'une CMS en milieu naturel nécessitait un avantage sélectif par rapport aux plantes fertiles coexistant dans les populations (Introduction, I-1-2). La répartition particulière du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire du cytoplasme *G* au profit de l'oxydase alterne pourrait avoir une incidence plus générale sur le métabolisme de la plante et constituer un avantage sélectif.

2-2-1-Régulation de l'AOX

L'AOX ne participe pas à la production d'ATP dans la mitochondrie et son rôle est associé à la régulation de métabolites clefs dans la cellule. Par exemple, lorsque la voie du

cytochrome *c* est saturée par le flux d'électrons, l'augmentation des rapports ATP/ADP et NADH/NAD⁺ s'accompagne d'un ralentissement du cycle de Krebs et en conséquence d'une baisse de la production des intermédiaires carbonés utilisés comme substrats dans différents compartiments de la biosynthèse cellulaire (Wagner et Moore 1997). En déviant les électrons des complexes III et IV, l'AOX permet donc de rééquilibrer le flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et de relancer le cycle de Krebs. Par ailleurs, l'activité de l'AOX peut être régulée de façon post-traductionnelle par différents facteurs. Le pyruvate est un activateur allostérique de l'enzyme (Day et Wiskich 1995), le NAD(P)H produit par le cycle de Krebs peut activer (par réduction) les dimères d'AOX (Vanlerberghe *et al.* 1998) et la concentration en quinone dans la membrane interne mitochondriale modifie aussi son activité (Ribas-Carbo *et al.* 1995).

Enfin, l'AOX est aussi exprimée en réponse à différents stress, comme la croissance en milieu pauvre en phosphate (Parsons *et al.* 1999), des blessures ou des attaques par des pathogènes (Simons *et al.* 1999), ainsi qu'en réponse à l'acide salicylique et l'éthylène (Chivasa et Carr 1998).

2-2-2-Résistance au froid

Le stress au froid est un des facteurs d'induction de l'oxydase alterne. L'AOX ne participe pas à la conservation de l'énergie puisque son activité enzymatique n'est pas couplée à la formation du gradient de protons. L'énergie est dissipée sous forme de chaleur. Toutefois, la dissipation de la chaleur associée à l'AOX est insuffisante pour lui attribuer un rôle dans la thermorégulation. La réponse à ce stress a plutôt été reliée à une compensation de la baisse de l'efficacité de la phosphorylation oxydative à basse température par une augmentation de l'activité de la voie alterne associée à la régulation du cycle de Krebs. Seule chez les plantes dont le développement floral est thermogénique, comme les Aracées, l'activité AOX a été associée à la production de chaleur dans la fleur (Elthon *et al.* 1989a).

Chez les betteraves portant le cytoplasme stérilisant (*G*) ou normal (*Nv*), bien que la comparaison du développement de la hampe florale n'ait pas été précisément quantifiée, des observations préliminaires semblent indiquer que les plantes mâle-stériles fleurissent plus tôt et que la durée de leur floraison est plus longue. Ces observations pourraient traduire une précocité de la montée à fleur induite par une diminution de la sensibilité au froid due à la sur-expression de l'AOX dans les tissus végétatifs de la CMS *G*. La précocité

et la persistance de la floraison des betteraves stériles pourrait constituer l'avantage sélectif de la CMS *G*.

2-2-3-Limitation de la production des espèces oxygénées réactives (ROS)

Des espèces oxygénées réactives comme les anions superoxydes ($\cdot\text{O}_2^-$), les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont des intermédiaires du métabolisme cellulaire hautement toxiques car très réactifs. S'ils ne sont pas rapidement éliminés, leur présence peut s'avérer extrêmement délétère pour la cellule et l'organisme. Le complexe III est associé à la production de ROS. Une des fonctions associées à l'oxydase alterne chez la plante est la réduction de la production des ROS en déviant le flux d'électrons de la voie du cytochrome *c* (Maxwell *et al.* 1999).

Chez le champignon *Podospora anserina* l'analyse de mutants déficients pour la cytochrome *c* oxydase a révélé un lien probable entre la sur-expression de l'AOX et une augmentation de la longévité du champignon due à la réduction de la production de ROS (Dufour *et al.* 2000).

L'augmentation de l'activité AOX dans le cytoplasme *G* couplée à la diminution de l'activité du complexe IV (et probablement du complexe III) s'accompagne certainement d'une réduction de la production de ROS dans les feuilles et peut-être dans les autres tissus. Ces modifications protègent les métabolites et l'information génétique mitochondriales contre les effets des stress oxydatifs pendant la vie de la plante et pourraient se traduire par un avantage sélectif en terme de longévité pour les plantes portant le cytoplasme *G*.

3-Hypothèses sur les mécanismes de la stérilité mâle cytoplasmique *G*

Les mécanismes d'induction de la stérilité mâle cytoplasmique sont extrêmement différents d'une CMS à l'autre. Parallèlement à la présence de facteurs stérilisants mitochondriaux agissant à un stade spécifique du développement de l'anthère, l'idée que les premiers tissus affectés par une déficience énergétique soient ceux de l'anthère est soutenue par l'étude de mutants de la chaîne respiratoire et l'augmentation de l'activité et du nombre de mitochondries dans ces tissus (voir Introduction).

La CMS *G* se caractérise par la présence de deux polypeptides mutés (*grande-NAD9* et *petite-COX2*) appartenant à des complexes de la chaîne respiratoire. Les résultats

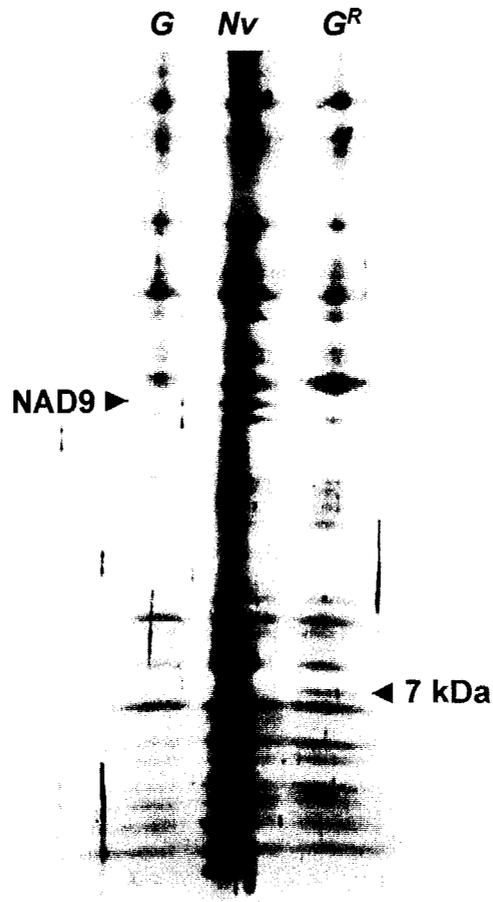


Figure 10 : Séparation en SDS-PAGE 16% de sous-unités du complexe I après une première dimension non dénaturante de fractions mitochondriales préparées à partir de feuilles de betteraves stérile (*G*), fertile (*Nv*) et restaurée (*G^R*). Gel coloré au nitrate d'argent.

obtenus dans cette étude ont été réalisés sur des préparations de feuilles de betteraves et ne permettent de prédire pas de l'implication des modifications de ces polypeptides dans les autres tissus de la plante, en particulier les tissus de l'anthere. Toutefois, à partir de ces données, plusieurs hypothèses peuvent être émises quant aux mécanismes de l'expression de la stérilité mâle chez *G*.

3-1-Implication du complexe I : *grande-NAD9*

Aucun dysfonctionnement n'a pu être attribué à *grande-NAD9* dans les mitochondries de feuilles de betterave. Toutefois, la composition des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire peut changer en fonction des tissus et du stade de développement de la plante. Chez le tabac et le pétunia la présence d'une sous-unité 2 de l'ATP synthase mitochondriale (ATP2) supplémentaire a été révélée à partir de préparation de mitochondries de grains de pollen (De Paepe *et al.* 1993). Chez le blé, la purification de la cytochrome *c* oxydase à partir de plantules et de graines en germination a aussi révélé une composition différente en sous-unités de ce complexe (Peiffer *et al.* 1990). Avec plus de 30 sous-unités dans le complexe I, on peut imaginer qu'une variation de sa composition en sous-unités dans les tissus de l'anthere peut être incompatible avec *grande-NAD9* et engendrer un dysfonctionnement de ce complexe pendant la gamétogenèse mâle.

Des études préliminaires visant à comparer la composition des sous-unités du complexe I des plantes portant le cytoplasme *G* stérile ou restaurée révèle la présence d'un polypeptide additionnel chez ces dernières (Figure 10). La stérilité mâle pourrait alors être restaurée par un changement d'une ou plusieurs sous-unités compatibles avec *grande-NAD9*. Toutefois, la betterave restaurée est sur fond nucléaire sauvage, différent des plantes cultivées. Il est donc difficile à ce stade d'associer ce polypeptide à un gène de restauration.

Enfin, la fonction de NAD9 est inconnue et ne semble pas directement impliquée dans les mécanismes d'oxydation du NADH. Il est possible que sa fonction soit ailleurs et que les mutations de *grande-NAD9* ne soit délétères qu'à certains stades du développement de la plante, peut-être par la perte d'interaction avec des cofacteurs du complexe I. NAD9 ne participant pas directement à l'oxydation du NADH, son affinité pour le NADH (Yamaguchi *et al.* 2000) laisse supposer que cette sous-unité peut en effet participer à la régulation de l'activité du complexe.

3-2-Implication du complexe IV : *petite-COX2*

Dans les stades végétatifs, la déficience de la cytochrome *c* oxydase peut être compensée par l'augmentation de la glycolyse et de l'activité de l'AOX. Mais la gamétogenèse mâle demande énormément d'énergie. Les tissus internes de l'anthere associés au développement des microspores ne sont pas photosynthétiques et l'énergie requise sous forme d'ATP est donc entièrement fournie par la mitochondrie. Le métabolisme mitochondrial du cytoplasme *G* lié à la déficience de la cytochrome *c* oxydase peut donc être incompatible avec le développement des boutons floraux des betteraves stériles.

Les déficiences de la chaîne respiratoire décrites à travers des dysfonctionnements de complexe I total ou partiel, montrent un gradient d'altérations phénotypiques touchant le développement général de la plante (Gutierrez *et al.* 1997) ou se limitant à la stérilité mâle (Heiser *et al.* 1997). Il est possible que la déficience respiratoire de la CMS *G* soit à un équilibre énergétique suffisant pour assurer le développement normal de la betterave mais insuffisant pour la production de pollen.

3-3-Discussion

Sur l'ensemble des différentes accessions de cytoplasme du groupe *G* rencontrées en populations naturelles, les sous-unités *grande-NAD9* et *petite-COX2* sont toujours associées. Aucun des autres cytoplasmes testés ne possède l'une de ces deux sous-unités modifiées. Par conséquent le lien entre ces deux sous-unités et la stérilité mâle laisse aussi supposer qu'elles soient impliquées toutes les deux dans l'expression et/ou le maintien de cette CMS en milieu naturel.

Par ailleurs, la stérilité mâle est induite très tôt dans le développement de l'anthere chez les plantes cultivées en l'absence de gènes de restauration. Par contre, chez les plantes descendant de croisements réalisés avec des CMS *G* restaurés la variabilité dans la production de grain de pollens viables et non viables varie de 0 à 95% (Partie I, Figure 3). Les phénotypes intermédiaires indiquent qu'une restauration partielle existe et que la stérilité mâle peut apparaître à différents stades de développement du grain de pollen. La restauration partielle peut traduire une compensation imparfaite des déficiences engendrées

par *grande-NAD9* et/ou *petite-COX2*. Si la baisse de production d'énergie est impliquée dans la stérilité alors on peut imaginer qu'en fonction des capacités des mitochondries à produire l'ATP, plusieurs stades de développement du grain de pollen peuvent être affectés, en commençant du moins consommateur vers les plus consommateurs d'énergie.

Enfin, le métabolisme du pollen est sensiblement différent de celui des organes végétatifs. Dans ces derniers, le pyruvate issu de la glycolyse entre dans le cycle de Krebs après transformation en acétyl-CoA.

Dans les tissus de l'anthere, le pyruvate est préférentiellement transformé en acétaldéhyde par décarboxylation. L'acétaldéhyde peut alors suivre deux voies (voir revue Tadege *et al.* 1999). Dans la première, il est transformé en alcool par une alcool-déshydrogénase et participe à la fermentation alcoolique. Cette voie est utilisée comme source complémentaire à la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie dans le pollen. Dans la deuxième voie, l'acétaldéhyde est transformé en acétate et peut participer aux différentes voies métaboliques de la biosynthèse (directement ou déshydrogéné pour former l'acétyl-CoA). Les changements métaboliques dans la CMS *G* pourraient être incompatibles avec le métabolisme particulier de l'anthere et conduire à l'avortement de la production de pollen.

**CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La comparaison du profil d'expression mitochondriale de la CMS *G* en synthèse *in organello* avec trois autres cytoplasmes de betteraves (*Nv*, *Owen* et *E*) a révélé un profil particulièrement original. Contrairement à la plupart des CMS décrites dans la littérature, nous n'avons pas détecté de polypeptides additionnels dans ce cytoplasme stérilisant. Par contre, la CMS *G* se caractérise par la présence de trois produits de synthèses variants en taille. Ces variants ont été identifiés et correspondent aux polypeptides NAD9, COX2 et au précurseur de COX2. NAD9 et COX2 sont deux sous-unités appartenant respectivement aux complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. De ce fait, la CMS *G* peut être considérée comme un mutant de la chaîne respiratoire.

La structure des gènes *Gnad9-1* et *Gnad9-2* ainsi que les différents profils RFLP obtenus avec la CMS *G* montrent qu'un grand nombre d'événements de recombinaison intra- et inter-génomiques, affectant l'ensemble du génome mitochondrial, sépare le type *G* de *Nv* qui est le plus fréquemment rencontré en population de betteraves maritimes en France. L'ensemble de ces réarrangements a donc abouti à l'organisation génomique stable du cercle maître de la CMS *G* que l'on rencontre aujourd'hui dans des populations de betteraves maritimes réparties du nord de la France à la pointe sud de l'Espagne. Toutefois, le séquençage des gènes codant pour les sous-unités NAD9 et COX2 montre que les variations de tailles observées au niveau protéique sont dues à des substitutions nucléotidiques affectant la taille des deux *orf*. Les modifications génomiques affectant la taille de ces sous-unités n'ont été retrouvées dans aucun des 22 cytoplasmes de betteraves maritimes recensés à ce jour et sont par conséquent caractéristiques de ce cytoplasme stérilisant.

La sous-unité *grande*-NAD9 de la CMS *G* possède une extension C-terminale et l'analyse de sa séquence nucléotidique prédit 5 changements d'acides aminés par rapport à *Nv*. Toutefois, nous avons montré que ces modifications n'altèrent ni l'assemblage du complexe I, ni son activité enzymatique dans les feuilles de betteraves. Par contre, la sous-unité *petite*-COX2 de la CMS *G* tronquée des 8 acides aminés de son C-terminal pourrait être responsable d'une déficience de la cytochrome *c* oxydase. En effet, l'activité de ce complexe est réduite de moitié dans la CMS *G*. Par ailleurs, ce complexe n'est pas résolu

en électrophorèse non dénaturante alors que le complexe IV de *Nv* a été formellement identifié. Ceci pourrait traduire une relative instabilité du complexe de la CMS *G* dans certaines conditions par rapport à *Nv* qui possède une sous-unité COX2 intacte. Nous avons pu corrélérer la déficience du complexe IV avec une sur-expression de l'oxydase alterne. Puisque la chaîne respiratoire mitochondriale est la principale source d'ATP dans la cellule, ces résultats suggèrent fortement que ces modifications affectent plusieurs compartiments du métabolisme cellulaire qui doit compenser les déficiences de la chaîne respiratoire pour permettre à la plante de conserver un développement normal.

L'étude détaillée du métabolisme cellulaire "adapté" du cytoplasme *G* offrirait certainement des réponses à la question de son maintien face aux plantes hermaphrodites en milieu naturel et aux avantages sélectifs conférés par ce cytoplasme stérilisant.

Bien que cette étude ait été menée sur des feuilles de betterave, l'ensemble des modifications décrites constitue une base solide pour l'investigation des mécanismes de l'expression de la stérilité mâle dans la fleur de la CMS *G*. Elle nous a permis d'émettre plusieurs hypothèses quant à ses mécanismes comme une incompatibilité des sous-unités modifiées et de leur complexe dans le pollen, une insuffisance énergétique ou une toxicité pollen-spécifique induite par les modifications métaboliques de la CMS *G*. Nous disposons aujourd'hui, en plus des couples CMS/mainteneur, de plantes possédant le cytoplasme *G* mais dont la fertilité mâle est restaurée par des facteurs nucléaires. L'étude comparée de ces trois types de plantes, en particulier de leur développement floral, est très prometteuse pour la compréhension des mécanismes moléculaires inducteurs de la CMS et la détermination de l'implication potentielle de grande-NAD9 et/ou petite-COX2 dans celle-ci.

Par ailleurs, une récente prospection au sud du Portugal (Fuseta) a révélé la présence dans une population mixte de betteraves (*B. macrocarpa* et *B.v. ssp. maritima*) d'un nouveau type mitochondrial. Les premières analyses RFLP (avec les sondes *ToN2*, *atp6*, *pBv4*) l'associent au groupe *G*, les plantes sont mâles-steriles, possèdent *Gcox2* et *Gnad9-2* (copie non exprimée). Par contre, nous n'avons pas obtenu d'amplification avec les amorces spécifiques *Gnad9-1* (grande-NAD9) mais le southern-blot réalisé avec une sonde *nad9* confirme la présence d'une deuxième copie de *nad9*. La séquence de cette copie originale de *nad9* pourrait constituer un élément de réponse quant à l'implication de grande-NAD9 dans la CMS.

L'implication de *grande-NAD9* et *petite-COX2* dans la stérilité mâle de la betterave n'a pas été démontrée mais ces deux polypeptides modifiés n'ont été rencontrés que dans le mitotype stérilisant *G* et les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire chez les plantes sont fortement associés à une altération de la production de pollen. Ces sous-unités spécifiques de la chaîne respiratoire mitochondriale de *G* ont dans un premier temps été identifiées parce que les modifications de leur séquence induisaient un changement de taille des protéines. Puisque aucun polypeptide variant n'a pu être mis en évidence dans la CMS *Owen* et la CMS *E* de la betterave, on ne peut pas exclure que des sous-unités mitochondriales soient altérées, sans changement de taille, et que dans ces cas aussi des déficiences de la chaîne respiratoire puissent être liées à la stérilité mâle induite par ces différents cytoplasmes.

L'étude de la CMS *G* a permis de montrer pour la première fois que mise à part la stérilité mâle, une altération de la chaîne respiratoire est compatible, avec le développement normal d'une plante et son maintien en milieu naturel, probablement associé à un avantage sélectif. Les populations naturelles représentent certainement un réservoir de variabilité métabolique jusqu'ici peu exploré, constitué sous l'influence d'un facteur extrêmement contraignant : la sélection naturelle.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abad, A.R. 1995. Specific Expression in Reproductive Tissues and Fate of Mitochondrial Sterility-Associated Protein in Cytoplasmic Male-Sterile Bean. *Plant Cell* 7:271-285.
- Backert, S., Dorfel, P., Lurz, R. et Borner, T. 1996. Rolling-circle replication of mitochondrial DNA in the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Mol. Cell Biol.* 16:6285-6294.
- Bellaoui, M., Grelon, M., Pelletier, G. et Budar, F. 1999. The restorer Rfo gene acts post-translationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids. *Plant Mol. Biol.* 40:893-902.
- Bellaoui, M., Martin-Canadell, A., Pelletier, G. et Budar, F. 1998. Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 257:177-185.
- Bellaoui, M., Pelletier, G. et 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.
- Bergman, P., Hernould, M. et Glimelius, K. 1994. The chimeric mitochondrial orf38/211 gene associated with cytoplasmic male sterility in tobacco is post transcriptionally edited. 4th international congress of plant molecular biology, Amsterdam 139.
- Blanc, V., Litvak, S. et Araya, A. 1995. RNA editing in wheat mitochondria proceeds by a deamination mechanism. *FEBS Letters* 373:56-60.
- Bonhomme, S., Budar, F., Lancelin, D., Small, I., Defrance, M.C. et G., P. 1992. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in Brassica cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 235:340-348.
- Boutin, V., Pannenbecker, G., Ecke, W., Schewe, G., Saumitou-Laprade, P., Jean, R., Vernet, P. et Michealis, G. 1987. Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*: genetical and molecular aspects. *Theor. Appl. Genet.* 73:625-629.
- Boutry, M. et Briquet, M. 1982. Mitochondrial modifications associated with the cytoplasmic male-sterility in faba beans. *Eur. J. Bioch.* 127:129-135.
- Boutry, M., Faber, A.-M., Charbonnier, M. et Briquet, M. 1984. Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male sterility. *Plant Mol. Biol.* 3:445-452.
- Brangeon, J., Sabar, M., Gutierrez, S., Combettes, B., Bove, J., Gendy, C., Chetrit, P., Des Francs-Small, C.C., Pla, M., Vedel, F. et De Paepe, R. 2000. Defective splicing of the first nad4 intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS1 nuclear mutant. *Plant J.* 21:269-280.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V. et Schmitz, U.K. 1992. The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J.* 11:3219-3227.
- 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. et Ortega, V.M. 1992. Organization of ATPA coding and 3' flanking sequences associated with cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.* 22:147-153.

- Chetrit, P., Rios, R., De Paepe, R., Vitart, V., Gutierrez, S. et Vedel, F. 1992. Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana glauca* protoclones. *Curr. Genet.* **21**:131-137.
- Chivasa, S. et Carr, J.P. 1998. Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* **10**:1489-1498.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. et Deléage, G. 2000. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TiBS* **25**:147-150.
- Combettes, B. et Grienenberger, J.M. 1999. Analysis of wheat mitochondrial complex I purified by a one-step immunoaffinity chromatography. *Biochimie* **81**:645-653.
- Conley, C.A. et Hanson, M.R. 1994. Tissues-specific protein expression in plant mitochondria. *Plant Cell* **6**:85-91.
- Connett, M.B. et Hanson, M.R. 1990. Differential mitochondrial electron transport through the cyanide-sensitive and cyanide-insensitive pathways in isonuclear lines of cytoplasmic male sterile, male fertile, and restored *Petunia*. *Plant Physiol.* **93**:1634-1640.
- Crews, S., Ojala, D., Posakony, J., Nishiguchi, J. et Attardi, G. 1979. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature* **277**:192-198.
- Cuguen, J., Wattier, R., Saumitou-Laprade, P., Forcioli, D., Mörchen, M., Van Dijk, H. et Vernet, P. 1994. Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Genet. Sel. Evol.* **26**:87-101.
- Cui, X., Wise, R.P. et Schnable, P.S. 1996. The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* **272**:1334-1336.
- Day, D.A. et Wiskich, S.P. 1995. Regulation of alternative activity in higher plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**:379-385.
- De Paepe, R., Forchioni, A., Chetrit, P. et Vedel, F. 1993. Specific mitochondrial proteins in pollen: presence of an additional ATP synthase beta subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5934-5938.
- Delannay, X. 1978. La gynodioecie chez les angiospermes. *Naturalistes Belges* **59**:223-235.
- Deng, P.S.K., Hatefi, Y. et Chen, S. 1990. N-arylazido-b-alanyl-NAD⁺, a new NAD⁺ photoaffinity analogue. Synthesis and labelling of mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochemistry Journal* **29**:1094-1098.
- Desplanque, B., Viard, F., Bernard, J., Forcioli, D., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J. et Van Dijk, H. 2000. The linkage disequilibrium between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.). *Mol. Ecol.* **9**:141-154.
- Dewey, R.E., Levings 3rd, C.S. et D.H., T. 1985. Nucleotide sequence of ATPase subunit 6 gene of maize mitochondria. *Plant Physiol.* **79**:914-919.
- Dewey, R.E., Levings, C.S. et Timothy, D.H. 1986. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* **44**:439-449.
- Dewey, R.E., Timothy, D.H. et Levings III, C.S. 1987. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5374-5378.
- Dewey, R.E., Timothy, D.H. et Levings III, C.S. 1991. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Curr. Genet.* **20**:475-482.
- Dill, C.L., Wise, R.P. et Schnable, P.S. 1997. Rf8 and Rf* mediate unique T-urf13-transcript accumulation, revealing a conserved motif associated with RNA

- processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize. *Genetics* **147**:1367-1379.
- Douce, R., Mannella, C.A. et Bonner, W.D.J. 1973. The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. *BBA* **292**:105-116.
- Duarte, M., Mota, N., Pinto, L. et Videira, A. 1998. Inactivation of the gene coding for the 30.4-KDa subunit of respiratory chain NADH dehydrogenase: is the enzyme essential for *Neurospora*? *Mol. Gen. Genet.* **257**:368-375.
- Dudareva, N.A., Popovsky, A.V., Kasjanova, U.V., Veprev, S.G., Mglinets, A.V. et Salganik, R.I. 1991. Expression of mitochondrial genes in fertile and sterile sugar beet cytoplasm with different nuclear fertility restorer genes. *Theor. Appl. Genet.* **83**:217-224.
- Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. et Sainsard-Chanet, A. 2000. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:4138-4143.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L. et McIntosh, L. 1989a. Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum guttatum*. *Planta* **180**:82-89.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L. et McIntosh, L. 1989b. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* **89**:1311-1317.
- Fauron, C., Casper, M., Gao, Y. et Moore, B. 1995. The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional. *Trends in Genetics* **11**:228-235.
- Fearnley, I.M. et Walker, J.E. 1992. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *BBA* **1140**:105-134.
- Forde, B.G., Oliver, R.J.C. et Leaver, C.J. 1978. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3841-3845.
- Frank, S.A. 1989. The evolutionary dynamic of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* **133**:345-376.
- Friedrich, T. et Scheide, D. 2000. The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases(1). *FEBS Letters* **479**:1-5.
- Friedrich, T., Steinmuller, K. et Weiss, H. 1995. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Letters* **367**:107-111.
- Giege, P. et Brennicke, A. 1999. RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:15324-15329.
- Gray, M.W. et Spencer, D.F. 1983. Wheat mitochondrial DNA encodes a eubacteria-like initiator methionine transfer RNA. *FEBS Letters* **161**:323-327.
- Grelon, M., Budar, F., Bonhomme, S. et Pelletier, G. 1994. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* hybrids. *Mol. Gen. Genet.* **243**:540-547.
- Grohann, L., Thieck, O., Schroder, W. et Brennicke, A. 1994. Translation of nad9 mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts. *Nucleic Acids Res.* **22**:3304-3311.
- Grosskopf, D. et Mulligan, R.M. 1996. Developmental- and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings. *Curr. Genet.* **29**:556-563.
- Gu, J., Miles, D. et Newton, K.J. 1993. Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize. *Plant Cell* **5**:963-971.

- Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Diolez, P., Degand, H., Boutry, M., Vedel, F., de Kouchovsky, Y. et de Paepe, R. 1997. Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana glauca* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3436-3441.
- Hakansson, G. et Glimelius, K. 1991. Extensive nuclear influence on mitochondrial transcription and genome structure in male-fertile and male-sterile alloplasmic *Nicotiana glauca* materials. *Mol. Gen. Genet.* **29**:380-388.
- Halldén, C., Bryngelsson, T. et Bosemark, N.O. 1988. Two new types of cytoplasmic male sterility found in wild *Beta* beets. *Theor. Appl. Genet.* **75**:561-568.
- Halldén, C., Lind, C. et Moller, M. 1992. Variation in mitochondrial translation products in fertile and cytoplasmic male-sterile sugar beets. *Theor. Appl. Genet.* **85**:139-145.
- Handa, H., Gualberto, J.M. et Grienenberger, J.M. 1995. Characterization of the mitochondrial orfB gene and its derivative, orf224, chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr. Genet.* **28**:546-552.
- Hanic-Joyce, P.J. et Gray, M.W. 1990. Processing of transfer RNA precursors in a wheat mitochondrial extract. *J. Bio. Chem.* **265**:13782-13791.
- Hartmann, C., Recipon, H., Jubier, M.F., Valon, C., Delcher-Besin, E., Henry, Y., De Buyser, J., Lejeune, B. et Rode, A. 1994. Mitochondrial DNA variability detected in a single wheat regenerant involves a rare recombination event across a short repeat. *Curr. Genet.* **25**:456-464.
- Hartmut, M. 1998. The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12819-12824.
- He, S., Abad, A.R., Gelvin, S.B. et 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., Lyznik, A. et Mackenzie, S. 1995. Pollen Fertility Restoration by Nuclear Gene *F_r* in CMS Bean : Nuclear-Directed Alteration of a Mitochondrial Population. *Genetics* **139**:955-962.
- Heiser, V., Rasmusson, A.G., Thieck, O., Brennicke, A. et Grohmann, L. 1997. Antisense repression of the mitochondrial NADH-binding subunit of complex I in transgenic potato plants affects male fertility. *Plant Science* **127**:61-69.
- Hernould, M., Mouras, A., Litvak, S. et Araya, A. 1992. RNA editing of the mitochondrial *atp9* transcript from tobacco. *Nucleic Acids Res.* **20**:1809.
- Hernould, M., Suharsono, S., Litvak, S., Araya, A. et Mouras, A. 1993. Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat. *P.N.A.S.* **90**:2370-2374.
- Herrmann, J.M., Koll, H., Cook, R.A., Neupert, W. et Stuart, R.A. 1995. Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Bio. Chem.* **270**:27079-27086.
- Horn, R., Köhler, R.H. et Zetsche, K. 1991. A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol. Biol.* **7**:29-26.
- Howad, W. et Kempken, F. 1997. Cell type-specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:11090-11095.
- Howad, W., Tang, H.V., Pring, D.R. et Kempken, F. 1999. Nuclear genes from Tx CMS maintainer lines are unable to maintain *atp6* RNA editing in any anther cell-type in the sorghum bicolor A3 cytoplasm. *Curr. Genet.* **36**:62-68.

- Ikeda, T.M., Shibasaka, M. et Tsunewaki, K. 1994. Respiratory activities, cytochrome composition and cytochrome *c* oxidase subunit II levels of mitochondria from alloplasmic wheats having *aegilops* cytoplasm. *Plant Cell Physiology* **35**:779-784.
- Ikeda, T.M. et Tsunewaki, K. 1996. Deficiency of *cox1* gene expression in wheat plants with *Aegilops columnaris* cytoplasm. *Curr. Genet.* **30**:509-514.
- Iwabuchi, M., Kyojuka, J. et Shimamoto, K. 1993. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J.* **12**:1437-1446.
- Jansch, L., Krufft, V., Schmitz, U.K. et Braun, H.P. 1996. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* **9**:357-368.
- Janska, H. et Mackenzie, S.A. 1993. Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility. *Genetics* **135**:869-879.
- Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M. et Mackenzie, S.A. 1998. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* **10**:1163-1180.
- Jassem, B. 1985. Variation of maritime beet (*Beta maritima* L.) from Brittany. *Gen. Pol.* **26**:463-469.
- Johns, C., Lu, M.Q., Lyznik, A. et Mackenzie, S. 1992. A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell* **4**:435-449.
- Kadowaki, K., Ozawa, K., Kazama, S., Kubo, N. et Akihama, T. 1995. Creation of an initiation codon by RNA editing in the *coxI* transcript from tomato mitochondria. *Curr. Genet.* **28**:415-422.
- Kamps, T.L., McCarty, D.R. et 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.
- Karpova, O.V. et Newton, K.J. 1999. A partially assembled complex I in NAD4-deficient mitochondria of maize. *Plant J.* **17**:511-521.
- Kempken, F., Howard, W. et Pring, D.R. 1998. Mutations at specific *atp6* codons which cause human mitochondrial diseases also lead to male sterility in a plant. *FEBS* **441**:159-160.
- Kennell, J.C. et 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.
- Kinoshita, T. 1976. Genetical studies on cytoplasmic male sterility induced by gamma ray irradiation in sugar beets. *Jpn. J. Breed.* **26**:256-265.
- Korth, K.L., Kaspi, C.I., Siedow, J.N. et Levings, C.S. 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.
- Kubo, T., Mikami, T. et Kinoshita, T. 1993. The sugar beet mitochondrial genome contains an ORF sharing sequence homology with the gene for 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Mol. Gen. Genet.* **241**:479-482.
- Kubo, T., Nishizawa, S. et Mikami, T. 1999. Alterations in organization and transcription of the mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Gen. Genet.* **262**:283-290.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A. et Mikami, T. 2000. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta*

- vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNACys(GCA). *Nucleic Acids Res.* **28**:2571-2576.
- Kubo, T., Satoh, Y., Muro, T., Kinoshita, T. et Mikami, T. 1995a. Physical and gene organization of mitochondrial DNA from the fertile cytoplasm of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Curr. Genet.* **28**:235-241.
- Kubo, T., Yanai, Y., Kinoshita, T. et Mikami, T. 1995b. The chloroplast trnP-trnW-petG gene cluster in the mitochondrial genomes of *Beta vulgaris*, *B. trigyna* and *B. webbiana*: evolutionary aspects. *Curr. Genet.* **27**:285-289.
- Kumar, R., Lelu, M.-A. et Small, I. 1995. Purification of mitochondria and mitochondrial nucleic acids from embryogenic suspension cultures of a gymnosperm, *Larix* μ *leptoeuropaea*. *Plant Cell Reports* **14**:534-538.
- Kumashiro, T., Asahi, T. et Komari, T. 1988. A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtained by fusion between *Nicotiana tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts. *Plant Sciences* **55**:247-254.
- Kyozuka, J., Kaneda, T. et Shimamoto, K. 1989. Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. *Bio/Technology* **7**:1171-1174.
- Lamatina, L., Gonzalez, D., Gualberto, J. et Grienenberger, J.M. 1993. Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Eur. J. Bioch.* **217**:831-838.
- Lance, C., Chauveau, M. et Dizengremel, P. 1985. High plant cell respiratory. Pp. 202-247 in R. Douce et D. A. Day, eds. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria, Heidelberg.
- Landgren, M., Zetterstrand, M., Sundberg, E. et Glimelius, K. 1996. Alloplasmic male-sterile Brassica lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol. Biol.* **32**:879-890.
- Laporte, V., Merdinoglu, D., Saumitou-Laprade, P., Butterlin, G., Vernet, P. et Cuguen, J. 1998. Identification and mapping of RAPD and RFLP markers linked to a fertility restorer gene for a new source of cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Theor. Appl. Genet.* **96**:989-996.
- Laser, B., Mohr, S., Odenbach, W., Oettler, G. et Kuck, U. 1997. Parental and novel copies of the mitochondrial *orf25* gene in the hybrid crop-plant triticale: predominant transcriptional expression of the maternal gene copy. *Curr. Genet.* **32**:337-347.
- Laser, B., Oettler, G. et Kück, U. 1995. RNA Editing fo the Mitochondrial *atpA/atp9* Co-Transcript of Triticale, Carrying the *timopheevi* Cytoplasmic Male Sterility Cytoplasm from Wheat. *Genetics* **107**:663-664.
- Laser, K.D. et Lersten, N.R. 1972. Anatomy and cytology of micro-sporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.* **38**:425-454.
- Lauer, M., Knudsen, C., Newton, K.J., Gabay-Laughnan, S. et J., L. 1990. A partially deleted mitochondrial cytochrome oxidase 2 gene in NCS6 abnormal growth mutant of maize. *New. Biol.* **2**:179-186.
- Laughnan, J.R. et Gabay-Laughnan, S. 1983. Cytoplasmic male sterility in maize. *Ann. Rev. Genet.* **17**:27-48.
- Laver, H.K., Reynolds, S.J., Moneger, F. et Leaver, C.J. 1991. Mitochondrial genome organisation and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J.* **1**:185-193.
- Lee, S.-L.J. et Warmke, H.E. 1979. Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male sterile corn. *Am. J. Bot.* **66**:141-148.

- Lefebvre, A., Scalla, R. et Pfeiffer, P. 1990. The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Mol. Biol.* **14**:477-490.
- Lennon, A.M., Pratt, J., Leach, G. et Moore, A. 1995. Developmental regulation of respiratory activity in pea leaves. *Plant Physiol.* **107**:925-932.
- Leterme, S. et Boutry, M. 1993. Purification and preliminary characterization of mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone reductase) from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* **102**:435-443.
- Letschert, J.P.W. 1993. *Beta* section *Beta*: biogeographical patterns of variation and taxonomy. *Wageningen Agricultural University Papers* **93**:1-137.
- Levings III, C.S. 1993. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell* **5**:1285-1290.
- Levings III, C.S. et Vasil, I.K. 1995. *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*. Kluwer
- L'Homme, Y., Stahl, R.J., X.Q., L., Hameed, A. et Brown, G.G. 1997. Brassica nap cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated orf224 gene. *Curr. Genet.* **31**:325-335.
- Li, X.Q., Chétrit, P., Mathieu, P., Vedel, F. et de Paepe, R. 1988. Regeneration of cytoplasmic male sterile protoclones of *Nicotiana sylvestris* with mitochondrial variations. *Curr. Genet.* **13**:261-266.
- Li, X.Q., Jean, M., Landry, B.S. et Brown, G.G. 1998. Restorer genes for different forms of brassica cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10032-10037.
- Lind, C., Hallden, C. et Moller, I.M. 1991. Protein synthesis in mitochondria purified from roots, leaves and flowers of sugar beet. *Physiol. P.* **83**:7-16.
- Lu, B. et Hanson, M.R. 1994. A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited atp6 transcripts. *Plant Cell* **6**:1955-1968.
- Lupold, D.S., Caoile, A.G. et Stern, D.B. 1999. The maize mitochondrial cox2 gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units. *J. Bio. Chem.* **274**:3897-3903.
- Mackenzie, S., Shichuan, H. et Lyznik, A. 1994. The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.* **105**:775-780.
- Maggouta, F., Michaelis, G., Mörchen, M., Saumitou-Laprade, P., Werber, B. et Weihe, A. 1994. Molecular studies of CMS in *Beta*.
- Makaroff, C.A., Apel, I.J. et Palmer, J.D. 1989. The atp6 coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male-sterile radish. *J. Bio. Chem.* **264**:11706-11713.
- Mann, V., Ekstein, I., Nissen, H., Hiser, C., McIntosh, L. et Hirschberg, J. 1991. The cytochrome oxidase II gene in mitochondria of the sugar beet *Beta vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* **17**:559-566.
- Mann, V.L., McIntosh, C., Theurer, C. et Hirschberg, J. 1989. A new cytoplasmic male sterile genotype in the sugar beet *Beta vulgaris* L.: a molecular analysis. *Theor. Appl. Genet.* **78**:293-297.
- Mannella, C.A. 1987. Isolation of the outer membrane of plant mitochondria. *Methods Enzymol.* **148**:453-464.

- Marienfeld, J.R. et Newton, K.J. 1994. The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric nad4-nad7 mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function. *Genetics* **138**:855-863.
- Marienfeld, J.R., Unseld, M., Brandt, P. et Brennicke, A. 1997. Mosaic open reading frames in the Arabidopsis thaliana mitochondrial genome. *Biol. Chem.* **378**:859-862.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. et McIntosh, L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8271-8276.
- McIntosh, L. 1994. Molecular biology of the alternative Oxidase. *Plant Physiol.* **105**:781-786.
- Monéger, F., Smart, C. et 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.
- Moore, A.L., Bonner, W.D. et Rich, P.R. 1978. The determination of the proton-motive force during cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**:298-306.
- Moore, A.L. et Siedow, J.N. 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *BBA* **1059**:121-140.
- Newton, K.J., Knudsen, C., Gabay-Laughnan, S. et Laughnan, J.R. 1990. An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell* **2**:107-113.
- Newton, K.J., Mariano, J.M., Gibson, C.M., Kuzmin, E. et Gabay-Laughnan, S. 1996. Involvement of S2 episomal sequences in the generation of the NCS4 deletion mutation in maize mitochondria. *Dev. Genet.* **19**:277-286.
- Newton, K.J. et Walbot, V. 1985. Maize mitochondria synthesize organ-specific polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:7363-7366.
- Nivison, H.T. et Hanson, M.R. 1989. Identification of a Mitochondrial Protein Associated with Cytoplasmic Male Sterility in Petunia. *Plant Cell* **1**:1121-1130.
- Nivison, H.T., Sutton, C.A., Wilson, R.K. et Hanson, M.R. 1994. Sequencing, processing, and localization of the petunia CMS-associated mitochondrial protein. *Plant J.* **5**:613-623.
- Nugent, J.M. et Palmer, J.D. 1991. RNA-mediated transfer of the gene coxII from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* **66**:473-481.
- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Kohchi, T., Ogura, Y., Kanegae, T., Akashi, K. et Ohyama, K. 1992. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort Marchantia polymorpha mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Bio.* **223**:1-7.
- op den Camp, R.G. et Kuhlemeier, C. 1997. Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Mol. Biol.* **35**:355-65.
- Owen, F.V. 1945. Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. *J. Agr. Res.* **71**:423-440.
- Palmer, J.M. et Ward, J.A. 1985. The oxydation of NADH by plant mitochondria. Pp. 173-201 in R. D. A. D. Douce, ed. *Higher Plant Cell Respiration*. Springer-Verlag, New-York.
- Parsons, H.L., Yip, J.Y. et Vanlerberghe, G.C. 1999. Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiol.* **12**:1309-1320.



- Peiffer, W.E., Ingle, R.T. et Ferguson-Miller, S. 1990. Structurally unique plant cytochrome c oxidase isolated from wheat germ, a rich source of plant mitochondrial enzymes. *Biochemistry* **29**:8696-8701.
- Penin, F., Godinot, C. et Gautheron, D.C. 1984. Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins using anionic and cationic detergents. *BBA* **775**:239-245.
- Pfeiffer, P. 1998. Nucleotide sequence, genetic organization and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *J. Gen. Vir.* **79**:2349-2358.
- Phreaner, C.G., Williams, M.A. et Mulligan, R.M. 1996. Incomplete editing of rps12 transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria. *Plant Cell* **8**:107-117.
- Pla, M., Mathieu, C., De Paepe, R., Chetrit, P. et Vedel, F. 1995. Deletion of the last two exons of the mitochondrial nad7 gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a *Nicotiana sylvestris* CMS mutant. *Mol. Gen. Genet.* **248**:79-88.
- Pring, D.R., Chen, W., Tang, H.V., Howad, W. et Kempken, F. 1998. Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male fertility in sorghum. *Curr. Genet.* **33**:429-436.
- Pring, D.R., Tang, H.V., Howad, W. et Kempken, F. 1999. A unique two-gene gametophytic male sterility system in sorghum involving a possible role of RNA editing in fertility restoration. *J Hered* **90**:386-393.
- Pring, D.R., Tang, H.V. et Schertz, K.F. 1995. Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. Pp. 461-495 in C. S. Levings III et I. K. Vasil, eds. The molecular biology of plant mitochondria. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Prioli, L.M., Huang, J. et Levings III, C.S. 1993. The plant mitochondrial open reading frame orf221 encodes a membrane-bound protein. *Plant Mol. Biol.* **23**:287-295.
- Rambaud, C., Dubois, J. et Vasseur, J. 1993. Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* **87**:347-352.
- Rasmussen, J. et Hanson, M.R. 1989. A NADH dehydrogenase subunit gene is co-transcribed with the abnormal *Petunia* mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility. *Mol. Gen. Genet.* **215**:332-336.
- Rasmusson, A.G., Heiser, V., Zabaleta, E., Brennicke, A. et Grohmann, L. 1998. Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *BBA* **1364**:101-111.
- Rasmusson, A.G., Mendel-Hartvig, J., Moller, I.M. et Wiskich, J.T. 1994. Isolation of rotenone-sensitive NADH-ubiquinone reductase (complex I) from red beet mitochondria. *Physiol. P.* **90**:607-615.
- Ribas-Carbo, M., Wiskich, J.T., Berry, J.A. et Siedow, J.N. 1995. Ubiquinone redox behaviour in plant mitochondria during electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**:156-160.
- Sadoch, Z. et Goc, A. 1997. Molecular characterization of fertile and sterile cytoplasms in *Beta* ssp. *Plant breeding* **116**:409-414.
- Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. et Nakazono, M. 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **35**:585-596.
- Saumitou-Laprade, P., Maggouta, F., Cuguen, J., Wattier, R., Van Dijk, H., Vernet, P. et Michaelis, G. 1993a. Cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* and the nucleo-cytoplasmic conflict. Pp. 249-258 in A. Brennicke et U. Kück, eds. *Plant Mitochondria with Emphasis on RNA Editing and Cytoplasmic Male Sterility*. VCH, Weinheim.

- Saumitou-Laprade, P., Pannenbecker, G., Boutin-Stadler, V., Michealis, G. et Vernet, P. 1991. Plastid diversity in natural population of *Beta maritima* showing additional variation in sexual phenotype and mitochondrial DNA. *Theor. Appl. Genet.* **81**:533-536.
- Saumitou-Laprade, P., Rouwendal, G.J.A., Cuguen, J., Krens, F.A. et Michaelis, G. 1993b. Different CMS sources found in *Beta vulgaris* ssp *maritima*: mitochondria variability in wild population revealed by a rapid screening procedure. *Theor. Appl. Genet.* **85**:529-535.
- Schnable, P.S. et Wise, R.P. 1994. Recovery of heritable, transposon-induced, mutant alleles of the rf 2 nuclear restorer of T-cytoplasm maize. *Genetics* **136**:1171-1185.
- Senda, M., Harada, T., Mikami, T., Sugiura, M. et Kinoshita, T. 1991. Genomic organization and sequence-analysis of the cytochrome-oxidase subunit-ii gene from normal and male-sterile mitochondria in sugar-beet. *Curr. Genet.* **19**:175-181.
- Senda, M., Onodera, Y., Kinoshita, T. et Mikami, T. 1995. Mitochondrial gene variation and phylogenetic relationships in the genus *Beta*. *Theor. Appl. Genet.* **90**:914-919.
- Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C. et Lambers, H. 1999. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. *Plant Physiol.* **120**:529-538.
- Singh, M. et Brown, G.G. 1991. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell* **3**:1349-1362.
- Singh, M. et Brown, G.G. 1993. Characterization of expression of a mitochondrial gene region associated with the Brassica "Polima" CMS: developmental influences. *Curr. Genet.* **24**:316-322.
- Singh, M., Hamel, N., Menassa, R., Li, X.-Q., Young, B., Jean, M., Landry, B.S. et Brown, G.G. 1996. Nuclear Genes Associated With a Single Brassica CMS Restorer Locus Influence Transcripts of Three Different Mitochondrial Gene Regions. *Genetics* **143**:505-516.
- Sluse, F.E. et Jarmuszkiewicz, W. 1998. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:733-747.
- Small, I., Suffolk, R. et Leaver, C.J. 1989. Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates. *Cell* **58**:69-76.
- Small, I.D., Isaac, P.G. et Leaver, C.J. 1987. Stoichiometric differences in DNA molecules containing the *atpA* gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial diversity in maize. *EMBO J.* **6**:865-869.
- Smart, C.J., Moneger, F. et Leaver, C.J. 1994. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell* **6**:811-825.
- Stern, D.B. et Newton, K.J. 1986. Isolation of plant mitochondrial RNA. *Methods Enzymol.* **118**:488-496.
- Tadege, M., Dupuis, I. et Kuhlemeier, C. 1999. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci.* **4**:320-325.
- Tang, H.V., Chang, R. et Pring, D.R. 1998. Cosegregation of single genes associated with fertility restoration and transcript processing of sorghum mitochondrial orf107 and urf209. *Genetics* **150**:383-391.
- Tang, H.V., Pring, D.R., Muza, F.R. et Yan, B. 1996a. Sorghum mitochondrial orf25 and a related chimeric configuration of a male-sterile cytoplasm. *Curr. Genet.* **29**:265-274.

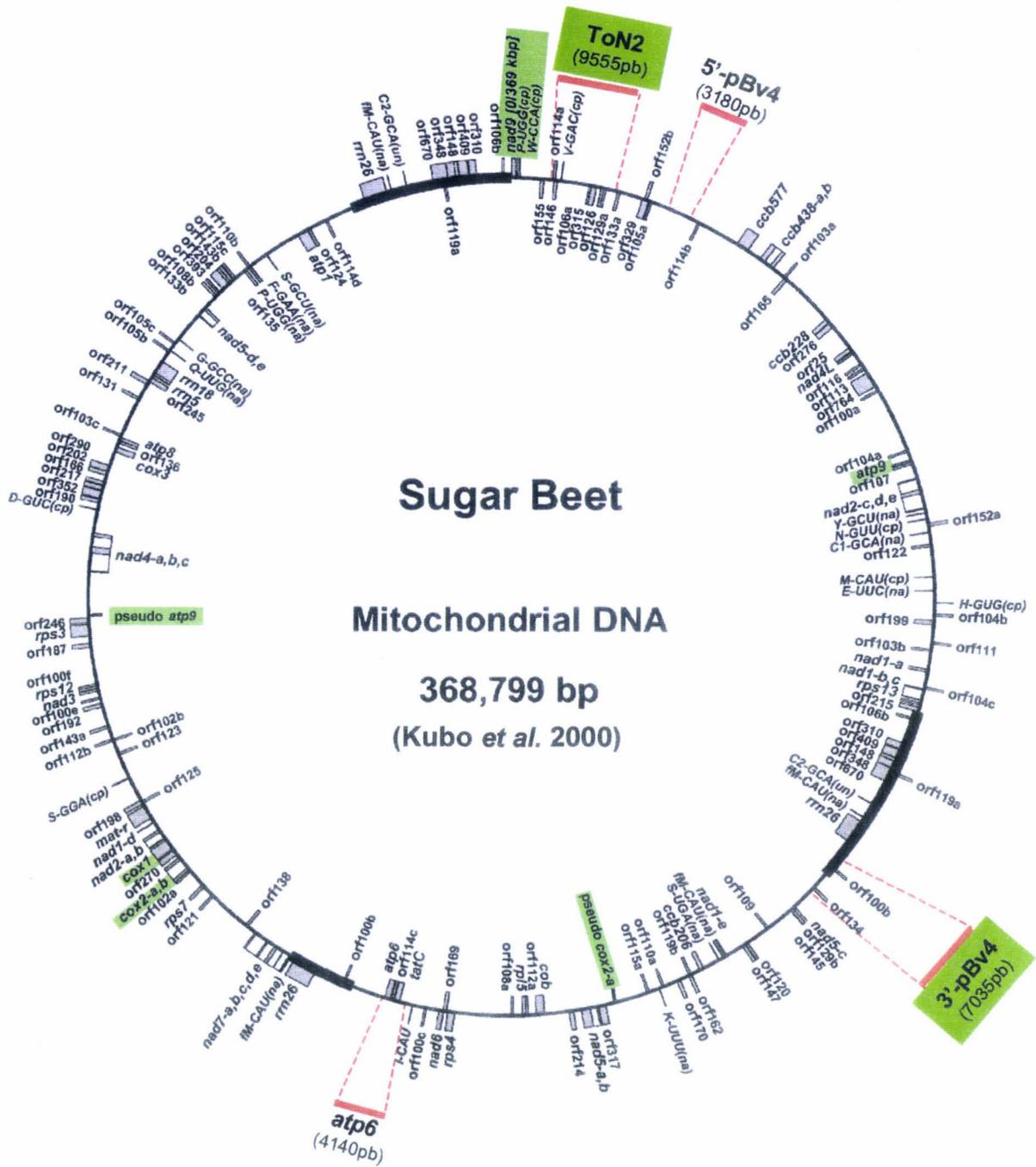
- Tang, H.V., Pring, D.R., Shaw, L.C., Salazar, R.A., Muza, F.R., Yan, B. et Schertz, K.F. 1996b. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. *Plant J.* **10**:123-133.
- Tolbert, N.E., Oeser, A., Kisaki, T., Hageman, R.H. et Yamazaki, R.K. 1968. Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Bio. Chem.* **243**:5179-5184.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. et Yoshikawa, S. 1996. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.5 Å. *Science* **272**:1136-1144.
- Umbach, A.L. et Siedow, J.N. 1993. Covalent and non-covalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* **103**:845-854.
- Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. et Brennicke, A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature genetics* **15**:57-61.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A.E. et McIntosh, L. 1995. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiol.* **109**:353-361.
- Vanlerberghe, G.C. et McIntosh, L. 1994. Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiol.* **105**:867-874.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. et Yip, J.Y. 1998. Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* **10**:1551-1560.
- Vanlerberghe, G.C., Yip, J.Y. et Parsons, H.L. 1999. In Organello and in Vivo Evidence of the Importance of the Regulatory Sulfhydryl/Disulfide System and Pyruvate for Alternative Oxidase Activity in Tobacco. *Plant Physiol.* **121**:793-803.
- Vedel, F., Pla, M., Vitart, V., Gutierrez, S., Chetrit, P. et De Paepe, R. 1994. Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants. *Plant Physiol. and Biochemist.* **32**:601-618.
- Wagner, A.M. et Moore, A.L. 1997. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep.* **17**:319-333.
- Walker, J.E. 1992. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chain. *Quart. Rev. Biophys.* **25**:253-324.
- Ward, B.L., Anderson, R.S. et Bendich, A.J. 1981. The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae). *Cell* **25**:793-803.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. et Preis, D. 1991. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Bioch.* **197**:563-576.
- Wen, L. et Chase, C.D. 1999. Pleiotropic effects of a nuclear restorer-of-fertility locus on mitochondrial transcripts in male-fertile and S male-sterile maize. *Curr. Genet.* **35**:521-526.
- Whelan, J., Millar, A.H. et Day, D.A. 1996. The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta* **198**:197-201.
- Wise, R.P., Dill, C.L. et Schnable, P.S. 1996. Mutator-induced mutations of the rfl nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of T-urf13 mitochondrial transcripts. *Genetics* **143**:1383-1394.

- Wise, R.P., Pring, D.R. et Gengenbach, B.G. 1987. Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T)-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:2858-2862.
- Wissinger, B., Brennicke, A. et Schuster, W. 1992. Regenerating good sense: RNA editing and trans splicing in plant mitochondria. *Trends in Genetics* **8**:322-328.
- Worstell, J.V., Kidd, H.J. et Schertz, K.F. 1984. Relationships among male-sterile inducing cytoplasms of sorghum. *Crop. Sci.* **24**:186-189.
- Xu, G.W., Cui, Y.X., Schertz, K.F. et Hart, G.E. 1995. Isolation of mitochondrial DNA sequences that distinguish male sterility-inducing cytoplasms in *Sorghum bicolor* (L.). *Theor. Appl. Genet.* **90**:1180-1187.
- Xue, Y.B., Collin, S., Davies, D.R. et Thomas, C.M. 1994. Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpA* loci. *Plant Mol. Biol.* **25**:91-103.
- Yamaguchi, M., Belogradov, G.I., Matsuno-Yagi, A. et Hatefi, Y. 2000. The multiple nicotinamide nucleotide-binding subunits of bovine heart mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Eur. J. Bioch.* **267**:329-336.
- Young, E.G. et Hanson, M.R. 1987. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* **50**:41-49.
- Zabaleta, E., Mouras, A., Hernould, M., Suharsono et Araya, A. 1996. Transgenic male-sterile plant induced by an unedited *atp9* gene is restored to fertility by inhibiting its expression with antisense RNA. *Proceeding of the National Academy of Science* **93**:11259-11263.
- Zimmerman, J.M., Eliezer, N. et Simha, R. 1968. The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *J. Theor. Biol.* **21**:170-201.

ANNEXES

ANNEXE I

Cartographie du génome mitochondrial de la betterave établie par Kubo *et al.* (2000) d'après la séquence nucléotidique complète. La localisation des 3 sondes *atp6*, *pBv4* et *ToN2* utilisées au laboratoire GEPV en RFLP pour déterminer les différents types mitochondriaux des betteraves maritimes (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) est indiquée (en rouge). Les régions potentiellement réarrangées dans la CMS *G* sont également indiquées (en vert).



- Localisation des sondes *atp6*, *pBv4* et *ToN2* et des fragments de restriction *EcoRI* associés.
- Régions potentiellement réarrangées chez la CMS G déduite d'après la séquence ou le profil d'hybridation.

ANNEXE II

Article I : accepté dans Theoretical and Applied Genetics

**NULCEAR EFFECT ON MITOCHONDRIAL PROTEIN EXPRESSION OF THE CMS
OWEN CYTOPLASM IN SUGAR BEET**

Eric Ducos, Pascal Touzet, Pierre Saumitou-Laprade, Philippe Vernet et Joël Cuguen.

NUCLEAR EFFECT ON MITOCHONDRIAL PROTEIN EXPRESSION OF THE
CMS *OWEN* CYTOPLASM IN SUGAR BEET

Eric Ducos^{1,3}, Pascal Touzet^{1,2}, Pierre Saumitou-Laprade¹, Philippe Vernet¹, Joël Cuguen¹.

¹ Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, UPRESA-CNRS
8016, FR CNRS 1818, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex
FRANCE.

² Université de Lille I, Institut Agro-Alimentaire de Lille (IAAL) , F-59655
Villeneuve d'Ascq cedex FRANCE

³ Unité de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, B-1348
Louvain la Neuve BELGIQUE.

Please send proofs to:

Pascal Touzet

Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales

Bât. SN2

Université de Lille I

59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

France

Tel : + 33.3.20.43.40.24

Fax : + 33.3.20.43.69.79

E-mail : Pascal.Touzet@univ-lille1.fr

Abstract

In sugar beet, cytoplasmic male sterility (CMS) is conferred by the *Owen* mitochondrion (*Svulg*). In order to find polypeptides specific to this cytoplasm and putatively involved in CMS, the protein expressions of *Svulg* and a non-sterilizing mitochondrion (*Nvulg*) were assessed by *in organello* protein synthesis of mitochondria isolated from leaves. Considering the hydrophobicity of mitochondrial translation products, the *in organello* synthesis polypeptides of both cytoplasm were compared with an acid-base two-dimensional electrophoresis adapted to hydrophobic protein separation. To evaluate the possible effect of nuclear background, the mitochondrial protein expression was assessed with three different nuclear backgrounds by using three near isogenic line pairs (NIL). A range of 3 to 4 variant polypeptides was revealed for each nuclear context. However, each variant polypeptide was specific to a nuclear-cytoplasmic context. Although the present study did not enable us to unambiguously find any variant polypeptide related to CMS, it reports an effect of the nucleus on mitochondrial gene expression.

Key words (5)

Nuclear-cytoplasmic male sterility, plant mitochondria, *in organello* synthesis, sugar beet, acid-base electrophoresis.

INTRODUCTION

The regulation of mitochondrial gene expression by nuclear genes is the key means by which the activities of the nuclear and organelle genetic systems are coordinated. In yeast, a large number of nuclear genes mediating the expression of specific mitochondrial genes have been identified (Costanzo and Fox 1990, Grivell 1995). But the mechanisms through which nuclear genes regulate mitochondrial gene expression are much less well understood in plants. A mitochondrial variation is phenotypically characterized by plants which are unable to produce functional pollen grains (CMS, cytoplasmic male sterility). CMS has been described in numerous higher plant species and has been used as a model to study nuclear-cytoplasmic interactions (see review by Schnable and Wise, 1998). Indeed, plants with sterilizing mitochondria can produce pollen grains thanks to the "counteraction" of nuclear genes which restore male fertility, the so-called restorer loci. In sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*), CMS was first introduced by F.V. Owen (1945). This so-called *Owen* cytoplasm is currently used worldwide for hybrid seed production. Despite extensive efforts, up to now the relationship between mitochondrial gene expression and male sterility has not been documented in beet. At the DNA level, data provided by restriction and hybridization analysis suggest that considerable rearrangements have occurred in the *Owen* mitochondrial genome with reference to a given non-sterilizing cytoplasm (Brears and Lonsdale 1988; Kubo *et al.* 1999). Recently, an RAPD polymorphism analysis between the *Owen* mitochondrion and a non-sterilizing mitochondrion revealed so many differences that it was impossible to ascribe any to CMS (Lorenz *et al.* 1997). The same phenomenon was encountered at the RNA level (Saumitou-Laprade *et al.* 1993a; Xue *et al.* 1994). In addition, a nuclear effect was suspected in several cases at the transcript level (Saumitou-Laprade *et al.* 1993a). Conversely, one-dimensional electrophoresis analysis of *in*

organello labeled polypeptides did not reveal any polymorphism between a given non-sterilizing cytoplasm and the *Owen* cytoplasm (Halldén *et al.* 1992). Within this framework, the present study reports the results of the following strategy :

- the protein expression of both mitochondrial types was assessed by *in organello* synthesis;
- considering the hydrophobicity of mitochondrial encoded polypeptides, the *in organello* synthesis products of both cytoplasms were compared by an acid-base two-dimensional electrophoresis adapted to hydrophobic protein separation;
- in order to take into account the putative effect of nuclear background, the mitochondrial protein expression was assessed on three different nuclear backgrounds by using three near isogenic line pairs (NIL).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Three near isogenic line pairs (NIL) of sugar beet were used in this study: INRA418 (INRA, France), FD33 (the Florimond Desprez Company, France) and FC603 (Fort Collins 603, USDA). They were kindly provided by INRA (Dijon, France) and the Florimond Desprez Company (France). A NIL pair is composed of two lines sharing approximately the same nuclear genome through recurrent back crosses, but differing by their cytoplasm (*Owen versus* non-sterilizing type). The following notation will be used, for example in the *INRA418* NIL pair: INRA418*s* is the line with the sterilizing cytoplasm, while INRA418*n* is the line with the 'normal' one. The lines bearing the sterilizing cytoplasm are male sterile whereas the ones bearing the 'normal' mitotype are male fertile, i.e. hermaphrodite. It must be noted that INRA418*s*, FD33*s* and FC603*s* exhibit identical male sterile phenotype.

Oligonucleotide fingerprinting

In order to estimate the nuclear similarity within and between NIL pairs, total DNA was digested by *Hae*III or *Eco*RI and hybridized with a (AAC)₅ or a (GATA)₄ oligonucleotide probe respectively, as described in the procedure of Weising *et al.* (1991) and Saumitou-Laprade *et al.* (1999).

Computation of nuclear similarity

Estimates of nuclear genetic similarity were based on the calculation of Jaccard's coefficient between two individuals, *i* and *j* (Jaccard 1908): $S_{ij} = a/(a+b+c)$ where *a* is the number of common bands between *i* and *j*, *b* the number of bands present in *i* and absent in *j*, and *c* the number of bands present in *j* and absent in *i*. This coefficient was computed between lines within a NIL pair. It provides an estimate of the nuclear isogenicity of the NIL pair, but also between lines from different NIL pairs, assessing the nuclear diversity among NILs.

Mitotyping

The mitochondrial type (mitotype) of each analyzed plant was determined with an RFLP procedure using three mitochondrial probes as described by Saumitou-Laprade *et al.* (1993b). Accordingly, both mitotypes were defined among 20 previously identified mitotypes (Desplanque *et al.* 1999): *Svulg* (the *Owen* CMS mitotype also called *S1* by Halldén *et al.* 1990) and *Nvulg*, the reference non-sterilizing mitotype in this study, which is the most frequently used in breeding programs.

In organello protein synthesis

Mitochondria were isolated from 2 g of young beet leaves and purified by ultracentrifugation on a discontinuous Percoll gradient (13.5%/26%/45%). Mitochondria were collected at the 26%/45% Percoll interface and incubated for 60 min at 25°C in a protein synthesis medium for *in vitro* ³⁵S-methionine labeling (Boutry *et al.* 1984).

Two-dimensional acid-base electrophoresis

First dimension consisted in a standard 12%-17% SDS-PAGE with an amount of 100.000 to 120.000 cpm of *in organello* synthesized proteins per lane. Five to six millimeter-wide strips were cut in the lane of interest and incubated 4 x 15 min with the cationic detergent in denaturing buffer (1% Tetradecyltrimethylammonium bromide (TDAB), 250 mM sucrose, 100mM KH₂PO₄, pH 4.0). The second dimension involved a 10%-16% discontinuous TDAB-PAGE (pH 3.0) with a 0.8% agarose acidic stacking gel (Pennin *et al.* 1984). Electrophoreses were conducted for 16 h at 50 V. Proteins were electroblotted on an Immobilon-P membrane in acidic buffer (85 mM Glycine, 20% Methanol, 0.03% TDAB, pH 3.0). The membranes were exposed 2 to 3 weeks on a BioMaxMR film for autoradiography.

Molecular mass was determined using the Pharmacia low molecular weight electrophoresis calibration kit.

RESULTS

Nuclear similarity within and between NIL pairs

Nuclear similarity within and between NIL pairs was estimated by oligonucleotide fingerprinting (Table 1). With a total number of 51 polymorphic bands, isogenicity within NIL pairs averaged 81.3%. A large nuclear diversity was found between NIL pairs (less or equal to 38 % of common bands, with an average of 30.4%). This material was therefore adapted to study the specific mitochondrial expression within a given nuclear background (intra NIL pair comparison) as well as the influence of the nuclear genome on the mitochondrial expression.

Two-dimensional electrophoresis analysis

To analyze the protein expression of the mitochondrial genome, the *in organello* synthesized products of mitochondria isolated from young leaves were analyzed by two-dimensional electrophoresis.

An acid-base electrophoresis was chosen to tentatively separate hydrophobic polypeptides and reveal any polymorphism between the *Svulg* and *Nvulg* mitochondrial protein expression patterns. This particular two-dimensional electrophoresis takes advantage of the fact that some polypeptides migrate differently when two different detergents are used, i.e. an anionic detergent (SDS) and a cationic one (TDAB). It is particularly appropriate for hydrophobic proteins which are barely separated by the classical isoelectric focusing first dimension. The total number of reproducible mitochondrial labeled products revealed by acid-base two-dimensional electrophoresis autoradiogram was about 55 (Figure 1).

Comparison of mitochondrial polypeptide expression within and between NIL pairs

The protein expression of both mitochondria was compared within each NIL pair. In order to only take into account the reproducible variations, three *in organello* syntheses were conducted for NIL pairs INRA418 and FD193 and two for the NIL pair FD392. In each case, the same plant was used for all experiments.

Considering each NIL separately, NIL FD33 revealed 3 variants, 2 of which were specific to *Svulg*; NIL INRA418 revealed 4 variants, 3 of which were specific to *Svulg*, and NIL FC603 revealed 3 variants, 2 of which were specific to *Svulg*. Thus for each nuclear context, reproducible polypeptides specific to a given cytoplasm, whether *Svulg* or *Nvulg*, were revealed.

Autoradiograms of NIL FD33 revealed the presence of spots 1 and 2 only in the sterile plant (Figure 2a) whereas spot 3 only appeared in the fertile plant (Figure 2b). Four variant spots were found for NIL INRA418. Spots 5,6 and 7 were present in the sterile plant (Figures 2c and 2e). Spot 4, which was specific to the fertile plant, was found within the area of spot 5 (Figures 2c and 2d). In NIL FC603, close variant spots 8 and 9 also migrated in the same area (Figures 2g and 2h), respectively in fertile and sterile plants. Spot 10 was only detected in the fertile plant (Figure 2g). Interestingly, close spots 4, 5 and 8, 9 were only separated by the second dimension of the acid-base electrophoresis. These variations of electrophoretic mobility may reflect short variation in size or in amino-acid composition resulting in modifications of charge and/or weight of these polypeptides (Noel *et al.* 1979).

When considering all three NILs, no variant was found, regardless of the nuclear background. Therefore the polypeptide variants revealed were specific to a given nuclear-cytoplasmic context. Results are summarized in Table 2.

DISCUSSION

Total in organello synthesis products revealed by autoradiography

Recent sequencing of the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial genome revealed that it potentially codes for 57 known genes coding for 3 ribosomal RNAs, 22 transfer RNAs but only 32 polypeptides. The presence of 85 additional ORFs has also been reported (Unsold *et al.* 1997, Marienfeld *et al.* 1997). Moreover, about 40 *in organello* synthesized polypeptides from tobacco leaves were separated by standard two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing gels as first dimension (De Paepe *et al.* 1993). It seems reasonable to suppose that the average of 55 mitochondrial labeled products separated by acid-base electrophoreses is representative of the beet mitochondrial protein expression.

Nuclear-cytoplasm interaction

When revealing the polypeptide pattern on SDS-PAGE of the *Nvulg* and *Svulg* mitotypes on the 3 NIL pairs, a total of 20 bands were observed, none of which was specific to a given cytoplasm. No differential polypeptide expression was revealed for both cytoplasms, whether with Tricine-SDS-PAGE (which improved separation of polypeptides below 30 kDa (Schägger *et al.* 1987)), or with TDAB-PAGE (data not shown). Similar results were previously described by Halldén *et al.* (1992) when they compared *in organello* syntheses of a non-sterilizing mitochondrion and *Svulg*.

Conversely, when considering polymorphism within a NIL pair, consistent differences could be detected by acid-base two-dimensional electrophoresis. For each nuclear background, 3 to 4 variants were revealed. We chose to monitor the mitochondrial protein expression of 3 NIL pairs representing a large nuclear diversity, as revealed by DNA fingerprinting. We postulated that only the variant

spots, which were present regardless of the nuclear background, could be considered as authentic cytoplasm-specific spots. With this criterion, none was selected.

Consequently, the present study illustrates the necessity to be particularly cautious when comparing mitochondrial expression to detect gene products related to a specific cytoplasm. Since strict isogenicity is never achieved within a NIL pair, the conclusions which can be drawn from the study of a single NIL are limited.

In addition, this study reports variations of *in organello* synthesized products by comparing 6 different nucleo-cytoplasmic contexts. These contexts seem to modify expression of at least 10 *in organello* synthesized polypeptides.

The results described in this paper on a few polypeptides could reflect a more general feature. In plants, the effect of the nucleus on mitochondrial gene expression was documented by studying mechanisms of male fertility restoration. Restorer loci, with alternative alleles, may also affect mitochondrial transcripts non-related to CMS (e. g. in rapeseed, Singh *et al.* 1996). Moreover, in a few cases, the action of non-restorer genes on specific mitochondrial gene expression has also been documented. For example the nuclear *Mct* gene alters the pattern of *cox2* transcripts of teosinte mitochondria within a maize nuclear background (alloplasmic effect) (Cooper *et al.* 1990). Rocheford and Pring (1994) also reported an extensive nuclear effect on *orf221* transcript patterns in maize. The originality of the present results is that they reflect nuclear-cytoplasmic interactions which are not the product of alloplasm. Indeed, the mitochondrial protein expression is monitored within the genetic diversity of a single subspecies. In addition, the observed nuclear effects are not due to the segregation of restorer loci, since each nuclear background is male sterility maintainer, i.e. lacks restorer alleles.

The origins of the variations observed in this study may be diverse. Differential editing influenced by the nuclear-cytoplasmic context has been reported in *Petunia*, where differential edited transcripts of ribosomal protein S12 gene (*rps12*) could be translated to give several forms of RPS12 (Lu *et al.* 1996). In addition, some mitochondrial gene products are translated into a premature form as is the case for the COX2 subunit (Pratje *et al.* 1983) and PCF, a chimeric gene product related to CMS in petunia (Nivison *et al.* 1994). It must be noted that *in organello* synthesis might favor the observation of such nuclear effect by revealing transient products as premature polypeptide forms.

Searching for mitochondrial sterilizing factors

Despite extensive efforts, no candidate mitochondrial gene inducing *Owen* CMS in sugar beet has been isolated. Even though the two-dimensional electrophoresis used in our study provided a good representation of the protein mitochondrial expression and polymorphism between both cytoplasms (*Nvulg* and *Owen*), no variant could be strictly correlated to one mitochondrial genotype over all three nuclear backgrounds. Different explanations can be proposed:

- the resolution of acid-base electrophoresis was not sufficient to detect the expression of sterilizing factors;

- in organello* synthesis patterns may remain unmodified in the *Owen* CMS. In rice, duplicated and rearranged *atp6* related to CMS may only affect the transcript level (Iwabuchi *et al.* 1993, Akagi *et al.* 1994);

- sterilizing factors may only occur in the reproductive tissues, as described in common bean in the CMS-associated *orf239* (Abad *et al.* 1995) and in sorghum for the *atp6* altered transcript (Howad and Kempken 1997). Moreover, Lind *et al.* (1991)

reported differences between polypeptide patterns of mitochondria isolated from roots, leaves and flowers in beet plants, which could not be related to the Owen CMS.

Recently, an original report by Kubo *et al.* (1999) described a tissue-specific modification of the transcript pattern of *coxI* within a single NIL pair between *Svulg* and a non-sterilizing mitotype in flower buds. Moreover, the transcript pattern of flower buds from restored plants is identical to the non-sterilizing cytoplasm. They consequently proposed *coxI* as a candidate gene for causing CMS. However, we do not know whether the modification observed on the 5' untranslated sequence might have an effect on translated products or could be detected by acid-base two-dimensional electrophoresis. Nevertheless, our results commend the highest caution when studying mitochondrial gene expression and show that it should be assessed on a large scale of nuclear diversity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We warmly thank Pr M. Boutry for hosting E.D. in his laboratory, for his valuable help and support. We wish to thank F. Budar, F. Viard and M. Valero for their critical review of the manuscript, B. Schweisguth and J-P. Denisot from INRA (Dijon - France) and the Florimond-Desprez Company (France) for the plant material, they also wish to thank J. Bernard, H. Degand and R. Dron for their technical expertise. This research was supported by grants from Région Nord-Pas de Calais, FEDER, the Tournesol Programme (Belgium/France) and an CNRS-FNRS International Cooperation Programme. E. D. received fellowships from the EC (PTP and the ESF Plant Adaptation Programme) and the University of Lille I (BQR).

The experiments comply with the current laws of the country in which the experiments were performed.

REFERENCES

- Abad AR, Mehrtens BJ, Mackenzie SA (1995) Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Genetics* 7:271-285
- Akagi H, Sakamoto M, Shinjyo C, Shimada H, Fujimura T (1994) A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr Genet* 25:52-58
- Boutry M, Faber AM, Charbonnier M, Briquet M (1984) Microanalysis of plant mitochondrial protein-synthesis products - detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male-sterility. *Plant Mol Biol* 3:445-452
- Brears T, Lonsdale DM (1988) The sugar beet mitochondrial genome: A complex organisation generated by homologous recombination. *Mol Gen Genet* 214:514-522
- Conley CA, Hanson MR (1995) How do alterations in plant mitochondrial genomes disrupt pollen development ? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27:447-457
- Cooper P, Butler E, Newton KJ (1990) Identification of a maize nuclear gene which influences the size and the number of *cox2* transcripts in mitochondria of perennial teosintes. *Genetics* 126:461-467
- Costanzo MC, Fox TD (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 24:91-113

- De Paepe R, Forchioni A, Chétrit P, Vedel F (1993) Specific mitochondrial proteins in pollen: Presence of an additional ATP synthase beta subunit. *Proc natl Acad Sci USA* 90:5934-5938
- Desplanque B, Viard F, Forcioli D, Bernard J, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Van Dijk H (1999) The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes in *Beta vulgaris* subsp *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Molecular Ecology* in press
- Grivell LA (1995) Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:121-164
- Halldén C, Lind C, Säll T, Bosemark NO, Bengtsson BO (1990) Cytoplasmic male sterility in *Beta* is associated with structural rearrangements of the mtDNA and is not due to interspecific organelle transfer. *J Mol Evol* 31:365-372
- Halldén C, Lind C, Moller IM (1992) Variation in mitochondrial translation products in fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beets. *Theor Appl Genet* 85:139-145
- Howad W, Kempken F (1997) Cell type-specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*. *Proc Natl Acad Sci* 94:11090-11095
- Iwabuchi M, Kyojuka J, Shimamoto K (1993) Processsing followed by complete editing of an altered *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *The EMBO Journal* 12:1437-1446
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44:223-270
- Kubo T, Mikami T, Kinoshita T (1995) Physical and gene organization of mitochondrial DNA from the fertile cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Curr Genet* 28:235-241

- Kubo T, Nishizawa S, Mikami T (1999) Alterations in organization and transcription of the mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol Gen Genet* 262:283-290.
- Lind C, Halldén C, Moller IM (1991) Protein synthesis in mitochondria purified from roots, leaves and flowers of sugar beet. *Physiol Plant* 83:7-16
- Lorenz M, Weihe A, Börner T (1997) Cloning and sequencing of RAPD fragments amplified from mitochondrial DNA of male-sterile and male-fertile cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 94:273-278
- Lu B, Wilson RK, Phreaner CG, Mulligan RM, Hanson MR (1996) Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial rps12 gene. *Mol Cell Biol* 16:1543-1549
- Marienfeld JR, Unseld M, Brennicke A (1997) Mosaic open reading frames in the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial genome. *Biol Chem* 378(8):859-862
- Nivison HT, Sutton CA, Wilson RK, Hanson MR (1994) Sequencing, processing, and localization of the petunia CMS-associated mitochondrial protein. *Plant Journal* 5(5):613-623
- Noel D, Nikaido K, Ames FL (1979) A single amino acid substitution in a histidine transport protein drastically alters its mobility
- Owen FV (1945) Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. *Journal of Agricultural Research* 71:423-440
- Pennin F, Godinot C, Gautheron DC (1984) Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins using anionic and cationic detergents. *Biochem Biophys Acta* 775:239-245

- Pratje E, Mannhaupt G, Michaelis G, Beyreuther K (1983) A nuclear mutation events processing of a mitochondrially encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 2:1049-1054
- Rocheford TR, Pring DR (1994) Interaction of nuclear and mitochondrial genomes in the alteration of maize mitochondrial orf221 transcripts. *Theor Appl Genet* 89:951-958
- Saumitou-Laprade P, Maggouta F, Cuguen J, Wattier R, Van Dijk H, Vernet P (1993a) Cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp *maritima* and the nucleo-cytoplasmic conflict. In: Brennicke A, Kück U (eds) *Plant Mitochondria with Emphasis on RNA Editing and Cytoplasmic Male Sterility*. VCH, Weinheim, pp. 249-258
- Saumitou-Laprade P, Rouwendal GJA, Cuguen J, Krens FA, Michaelis G (1993b) Different CMS sources found in *Beta vulgaris* ssp *maritima*: mitochondria variability in wild population revealed by a rapid screening procedure. *Theor Appl Genet* 85:529-535
- Saumitou-Laprade P, Piquot Y, Raspé O, Bernard J, Vrieling K (1999) Plant DNA fingerprinting and profiling. In: Epplen JT, Lubjuhn T (eds) *DNA Profiling and DNA Fingerprinting*. Birkhauser Verlag Basel, , pp 17-38
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379
- Schnable PS, Wise RP (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science* 3, 175-180
- Singh M, Hamel N, Menassa R, Li X-Q, Young B, Jean M, Landry BS, Brown GG (1996) Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus

influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143:505-516

Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature genetics* 15:57-61

Weising K, Beyermann B, Ramser J, Kahl G (1991) Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* 12:159-169

Xue YB, Collin S, Davies DR, Thomas CM (1994) Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpA* loci. *Plant Mol Biol* 25:91-103

Table 1: Estimation of the nuclear similarity within and among NIL pair by oligonucleotide fingerprinting.

For each line to line comparison, the ratio of the number of common bands over the total number of bands is given.

Genotype	FD33s	FD33n	INRA418s	INRA418n	FC603s	FC603n
FD33s	1 (26/26)	0.96 (25/26)	0.36 (14/39)	0.37 (14/38)	0.29 (12/42)	0.26 (9/35)
FD33n		1 (25/25)	0.37 (14/38)	0.38 (14/37)	0.27 (11/42)	0.26 (9/34)
INRA418s			1 (27/27)	0.89 (25/28)	0.31 (13/42)	0.22 (8/37)
INRA418n				1 (26/26)	0.35 (14/40)	0.22 (8/36)
FC603s					1 (28/28)	0.59 (17/29)
FC603n						1 (18/18)

Table 2: Comparison of the mitochondrial expression of the 3 NIL pairs as revealed by acid-base two-dimensional electrophoresis.

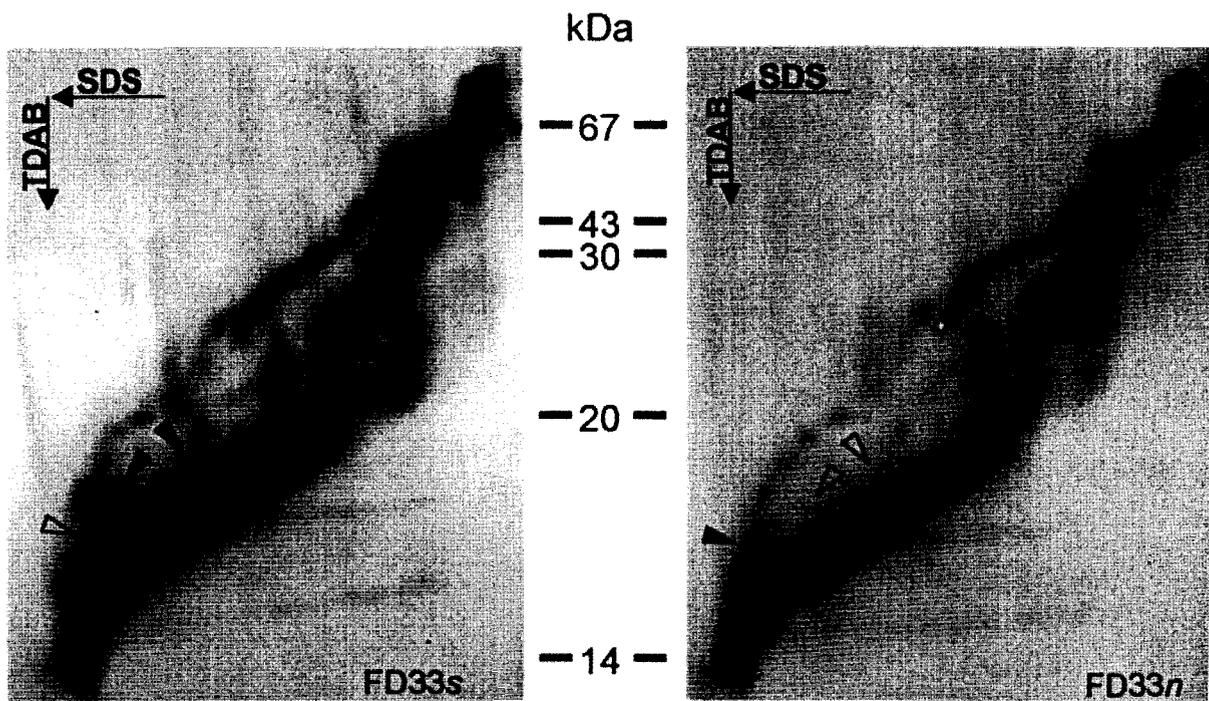
The nucleo-cytoplasmic context in which the spot is present is indicated by a cross.

	Spot identification									
	(spot size kDa)									
Genotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	(20)	(19)	(17)	(46)	(39)	(29)	(21)	(24)	(22)	(17)
FD33 _s	X	X								
FD33 _n			X							
INRA418 _s					X	X	X			
INRA418 _n				X						
FC603 _s									X	X
FC603 _n								X		

FIGURE LEGENDS

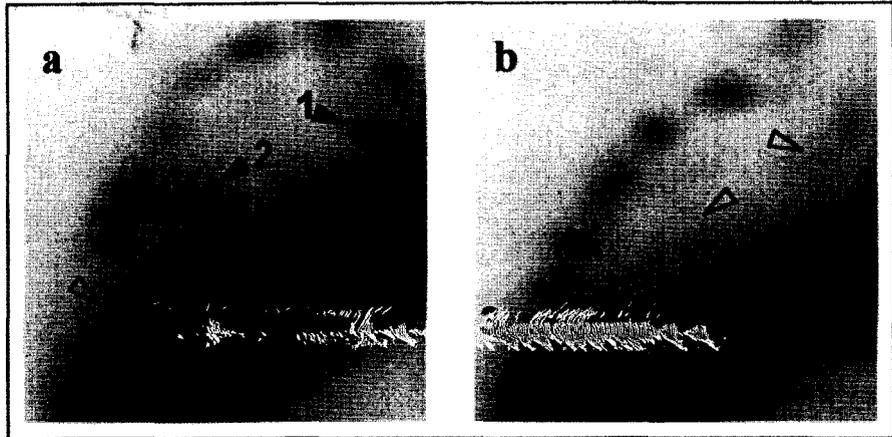
Figure 1: Autoradiograms of the acid-base electrophoresis gels. Comparison of mitochondrial polypeptide expression within the NIL FD33 pair from young leaves. Variant spots are indicated by black arrowheads; their position is indicated by white arrowheads in the line where they are absent.

Figure 2: Polypeptide variants between *Svulg* and *Nvulg* revealed by acid-base electrophoresis. Focus on autoradiograms are presented for a) FD33*s*, b) FD33*n* c) and e) INRA418*s*, d) and f) INRA418*n*, g) FC603*s*, h) FC603*n*. Variant spots are indicated by black arrowheads; their position is indicated by white arrowheads in the line where they are absent.

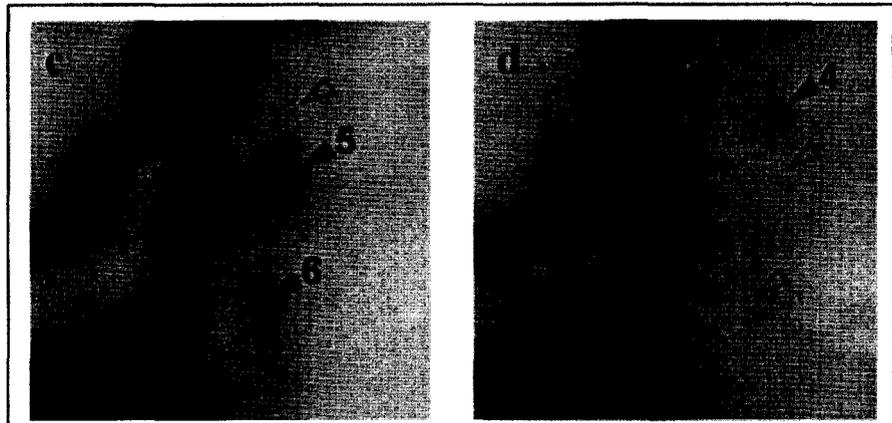


Svulg

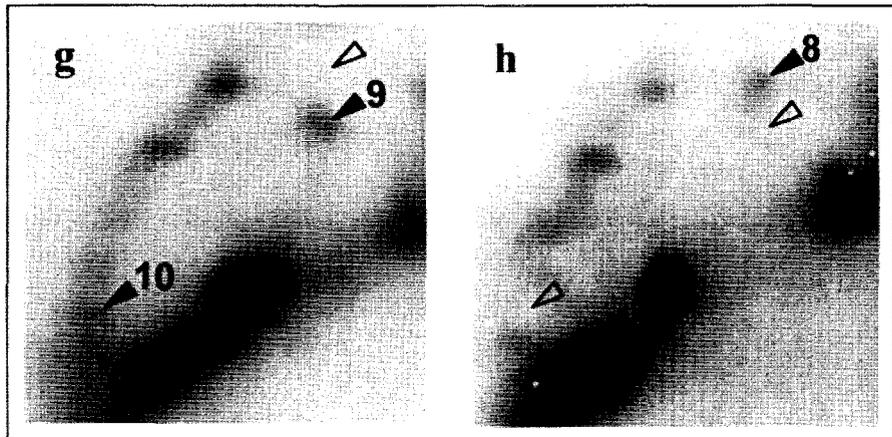
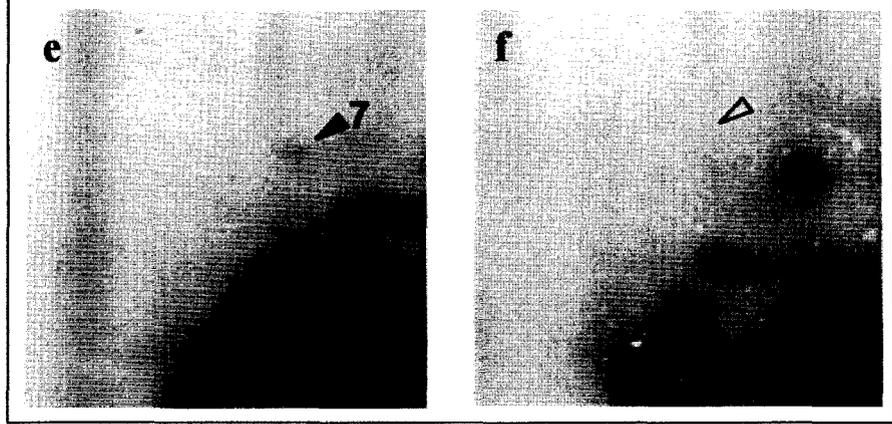
Nvulg



FD33



INRA418



FC603

ANNEXE III

Publication réalisée dans le cadre du colloque "Plant Mitochondria : from gene to function" qui s'est tenu à Aronsborg (Suède) du 22 au 27 juin 1998. Il rend compte des premières caractérisations de l'expression protéique du cytoplasme *G*.

ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL PROTEIN EXPRESSION IN WILD BEET IN RELATION TO CYTOPLASMIC MALE STERILITY

Eric Ducos, Pascal Touzet, Pierre Saumitou-Laprade, Joël Cuguen et Marc Boutry.

ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL PROTEIN EXPRESSION IN WILD BEET IN RELATION TO CYTOPLASMIC MALE STERILITY

ERIC DUCOS, PASCAL TOUZET¹, PIERRE SAUMITOU-LAPRADE, JOËL CUGUEN, and MARC BOUTRY².

Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, URA-CNRS 1185, Université de Lille I, FRANCE.

¹ *Institut Agricole et Alimentaire de Lille et Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, URA-CNRS 1185, Université de Lille I, France*

² *Unité de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, Belgique.*

Introduction

A much-debated issue in plant evolutionary biology concerns the maintenance of a high frequency of male sterility in natural populations. Recent molecular studies on cytoplasmic male sterility (CMS) which mainly focused on cultivated species indicate that novel chimeric genes, resulting from duplications and rearrangements of mitochondrial DNA sequences, are involved in its control (Conley and Hanson 1995). Molecular data therefore fits the theoretical models that do not consider the CMS to be a deleterious mitochondrial mutation but the coevolution of the nuclear and mitochondrial genomes (Cosmides and Tooby 1981). It is nevertheless worth noting that nothing is known about the molecular structure of the genes involved in naturally occurring CMS which are subject to natural selection. We present a molecular study of CMS encountered in wild beet populations by comparing the protein expression of mitochondria associated or not associated with male sterility.

In sugar beet (*Beta vulgaris*), CMS was first introduced by Owen (1945) and it is used world-wide for hybrid seed production. Populations along the French Atlantic coast of *Beta maritima*, which is the ancestor form of sugar beet, have drawn our attention because of the high proportion of male sterile plants. Five different mitotypes have been associated with CMS and identified by genetic and molecular analysis (Saumitou-Laprade 1993). Mitotypes E and G were frequently encountered (Cuguen *et al.* 1994). These two new sources of CMS have been introduced into cultivated beet breeding programs conducted by INRA (Dijon, France). Several near-isogenic line pairs, with differing cytoplasms (E or G versus 'Normal' mitotype), are therefore available. We propose to take advantage of this genetic material to study the protein expression of G and Normal mitochondria in different nuclear backgrounds in order to reveal a putative variation in peptide expression between CMS mitochondria and normal ones.

Materials and methods

Plant material

Four near isogenic line pairs (NIL) of sugar beet (*Beta vulgaris*) were supplied by M. Scheissguth and J.-P. Denisot (INRA, Dijon, France). A NIL pair is composed of two lines

having approximately the same nuclear genome but differing in their cytoplasm: *N* or *G* types. The characteristics of the plants are described in table 1. Isogenicity within NIL pairs was checked by oligonucleotide fingerprinting (Weising *et al.* 1991) and mitotypes by southern hybridisation using mitochondrial specific probes (Saumitou-Laprade, 1993).

In organello protein synthesis

Mitochondria were isolated from 2g of young beet leaves and purified by ultracentrifugation on a discontinuous Percoll gradient (13.5%/21%/45%). Mitochondria were collected at the 21%/45% Percoll interface and incubated 40 min at 25°C in synthesis medium for *in vitro* ³⁵S-met labelling, as in the protocol described by Boutry *et al.* (1984).

Mitochondrial membrane/matrice proteins separation

After *in vitro* ³⁵S-met labelling, mitochondria were pelleted and resuspended in 100 µl of 7% mannitol suspension buffer. Membranes were broken by 5 cycles of freezing-thawing-vortex. The mitochondrial vesicles were then carefully laid on 50 µl of 9% mannitol suspension buffer and ultracentrifuged 60 min at 100.000g. Proteins of supernatant were precipitated by methanol/chloroform protocol. Proteins of supernatant and proteins of pellet were resuspended in sample buffer for SDS-PAGE.

Analyse of ³⁵S-met labelled mitochondrial polypeptides

Mitochondrial syntheses were analysed on SDS-discontinuous PAGE under standard conditions using 12%-17% polyacrylamide gradient or constant 15% polyacrylamide gel. Proteins were electroblotted on Immobilon-P membrane. The membranes were stained with Coomassie blue solution and exposed 8 to 15 days on BioMaxMR film for autoradiography.

*Two-dimensional Acid/Base electrophoresis: (Penin *et al.* 1984)*

First dimension consisted in a standard 12%-17% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were fixed and stained with Coomassie blue solution, and then destained. Strips of 5-6 mm wide were cut in the lane of interest and incubated 4x15 min with the second cationic detergent in the denaturing buffer (TDAB 1%, sucrose 250 mM, KH₂PO₄ 100 mM, pH 4.0). Second dimension involved discontinuous gel electrophoresis 14% TDAB-PAGE (pH 3.0) with an 0.8% agarose acidic stacking gel. After electrophoresis, proteins were electroblotted on Immobilon-P membrane in acidic buffer. The membranes were stained with Coomassie blue solution and exposed 2 to 3 weeks on BioMaxMR film for autoradiography.

Table 1. Nuclear, cytoplasmic characteristics and sexual phenotype of the different beet lines that were analysed.

Plant	Nuclear background	Number of back-crosses	Mitotype	Pollen
P435	2558	5	<i>N</i>	YES
Pg435	2558	5	<i>G</i>	NO
Q518	126	11	<i>N</i>	YES
Qg518	126	10	<i>G</i>	NO
Po89	564	7	<i>Owen</i>	NO
Q525	564	8	<i>N</i>	YES
Qg525	564	7	<i>G</i>	NO
Po347	2766	6	<i>Owen</i>	NO
Q535	2766	6	<i>N</i>	YES
Qg535	2766	6	<i>G</i>	NO

Results

Mitochondrial polypeptides patterns after Coomassie blue staining

Coomassie blue staining (Fig. 1a) revealed very similar polypeptide patterns with all the four nuclear backgrounds for both cytoplasms. However, it is a fact that 80% to 90% of the proteins present in mitochondria are encoded by the nucleus and imported into the organelle. Most of the proteins observed on the stained membrane have a nuclear origin.

Mitochondrial polypeptides patterns after autoradiography

Autoradiography of the membrane (Fig. 1b) only revealed polypeptides that were labelled during the *organello* synthesis. *G* Cytoplasm displays a very different pattern of mitochondrial protein expression than to the other cytoplasm tested (it remains different even when compared with the *Owen* cytoplasm analysed on 2 nuclear backgrounds). We found three polypeptides, T1, T2 and T3 which are expressed in the *G* cytoplasm but not in the *N* type. In the opposite, three polypeptides are lacking in *G* and present in the other cytoplasm. The intensity of the radioactive signals and the size of the variant polypeptides seem to suggest that the 3 *G* variants are in repulsion against these *N* variants, as if they were the consequence of allelic variations. Separation of matrix/membrane proteins revealed that all three variants were located in the mitochondrial membrane (Fig. 2).

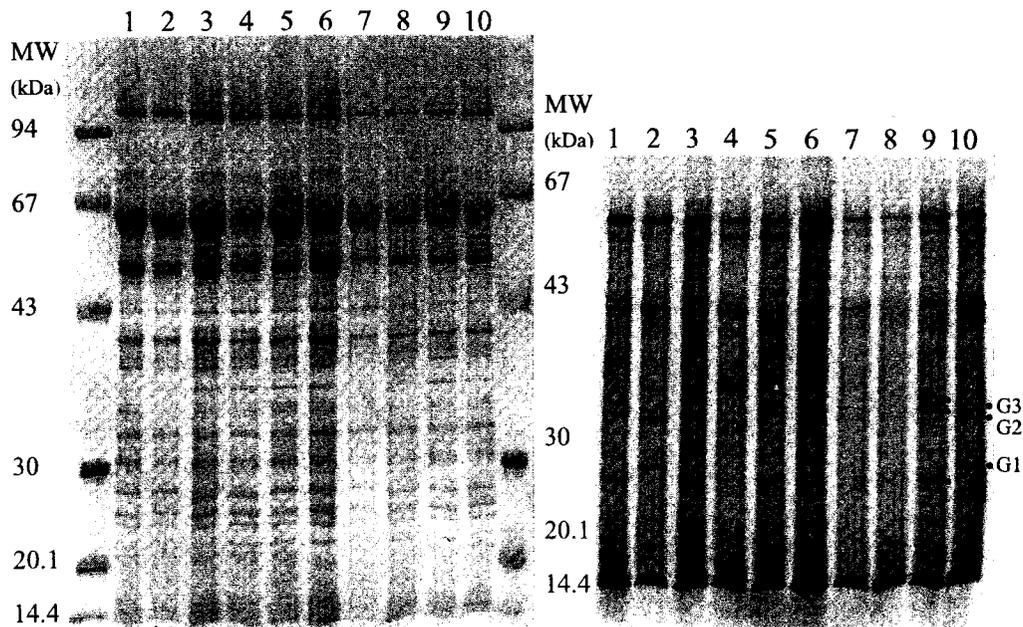


Figure 1a

Figure 1b

Fig. 1a. Polypeptide separation on 12%-17% gradient SDS-PAGE, after electroblotting on Immobilon-P membrane and staining with Coomassie brilliant blue. Lanes 1-10, respectively P435, Pg435, Q518, Qg518, Po89, Q525, Qg525, Po347, Q535, Qg535.

Fig. 1b. Direct autoradiography of the membrane shown on fig. 1a, revealing *in organello* protein synthesis products. Each lane contain 3×10^5 cpm.

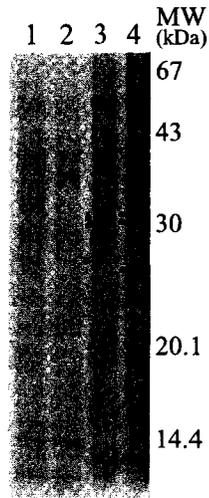


Fig. 2. Direct autoradiography of 15% SDS-PAGE after electroblotting on Immobilon-P membrane. Lanes 1 and 2, fraction corresponding to the hydrophilic proteins after *in organello* synthesis and matrix/membrane protein separation, respectively *G*, *N* cytoplasms. Lanes 3 and 4, fraction corresponding to the hydrophobic proteins, respectively *G*, *N* cytoplasms. Variant polypeptides are marked by dots.

Two-dimensional base/acid electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis (Fig. 3) revealed about 50 mitochondrial polypeptides. Comparing autoradiography and Coomassie blue staining of the membrane, we obtained a strong radioactive signal for variant spots, a very low coloured protein for spot T1 and no coloured protein for spots T2 and T3. These results suggest that the three polypeptides are highly expressed *in vitro* but not *in vivo*. Globally, we hardly found any radioactive spots associated to coloured spots on the membrane.

We noticed that spot T3 seemed to be made of two closed spots which separated in the second acid dimension. This pattern is what can be expected in the case of a precursor which is partially matured by *in vitro* synthesis.

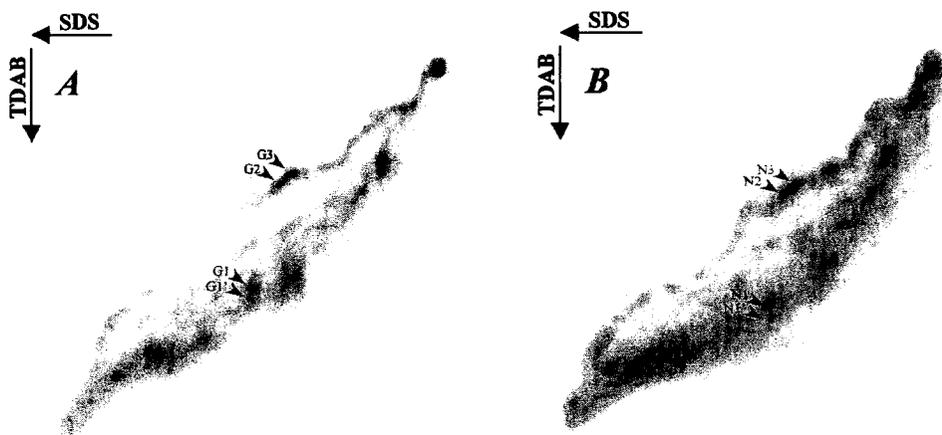


Fig. 3. Direct autoradiography of two-dimensional acid-base electrophoresis after transfer on Immobilon-P membrane. A, B *in organello* synthesis products patterns, respectively, of *G* and *N* cytoplasm. Variant polypeptides are marked by arrows.

Conclusion

We compared the protein expression of wild beet *CMS G* cytoplasm and the *N Type* on four different nuclear backgrounds. Three variant polypeptides were clearly associated with the *G* cytoplasm and were not found in the *Owen* cytoplasm, for both nuclear backgrounds tested. These three polypeptides are probably allelic forms of polypeptides also present in the two other cytoplasm but with a different size, corresponding to a variation of about ten amino-acids. All of them seem to be associated with the mitochondrial membrane but up to now it has not been possible to link them to a complex of mitochondrial respiratory channel. In order to identify the nature of these variants, microsequencing as well as native polyacrylamide electrophoresis (Jänsch *et al.* 1996) are being undertaken. CMS is generally associated with a novel chimeric gene present in the sterile cytoplasm. If one of these *G* variants can be associated with the expression of male sterility, it would be interesting to understand the mechanism of this type of CMS, which is due to a modification of mitochondrial polypeptides and not to a new gene.

Acknowledgements

The authors wish to thank B. Schweisguth and J-P. Denisot from INRA (Dijon - France) for the plant material, H. Degand and R. Dron for their technical expertise. This research was supported by grants from Région Nord-Pas de Calais, FEDER, from the Tournesol Programme (Belgium/France). E. D. received a grant from ESF (Plant Adaptation Programme).

References

- Boutry, M., Faber, A.M., Charbonnier, M. & M. Briquet, M. 1984. Microanalysis of plant mitochondrial protein-synthesis products – detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male-sterility. *Plant Mol. Biol.* 3: 445-452.
- Cosmides, L. M. & Tooby, J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *J. Theor. Biol.* 89: 83-129.
- Conley, C. A. & Hanson, M. R. 1995. How do alterations in plant mitochondrial genomes disrupt pollen development? *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:447-457.
- Cuguen, J., Wattier, R., Saumitou-Laprade, P., Forcioli, D., Mörchen, M., Van Dijk, H. & Vernet, P. 1994. Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris ssp maritima*. *Genet. Selec. Evol.* 26: 87s-101s.
- Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K & Braun, H-P. 1996. New insights into the composition, molecular mass, and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* 9: 357-368.
- Owen, F.V. 1945. Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. *J. Agric. Res.* 71: 423-440.
- Pennin, F., Godinot, C. & Gautheron, D.C. 1984. Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins using anionic and cationic detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 775: 239-245.
- Saumitou-Laprade, P., Rouwendal, G.J.A., Cuguen, J., Krens, F.A. & Michaelis, G. 1993. Different CMS sources found in *Beta vulgaris ssp maritima*: mitochondria variability in wild population revealed by a rapid screening procedure. *Theor. Appl. Genet.* 85: 529-535.
- Weising, K., Beyermann, B., Ramser, J. & Kahl, G. 1991. Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* 12: 159-169.

ANNEXE IV

Article II : soumis à The Plant Journal

Cet article reprend les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse.

THE MALE STERILE G CYTOPLASM OF WILD BEET DISPLAYS MODIFIED MITOCHONDRIAL RESPIRATORY COMPLEXES

Eric Ducos, Pascal Touzet et Marc Boutry.

Biological sciences, Plant Biology

THE MALE STERILE G CYTOPLASM OF WILD BEET DISPLAYS MODIFIED
MITOCHONDRIAL RESPIRATORY COMPLEXES

Eric Ducos^{*†}, Pascal Touzet^{*†}, Marc Boutry[‡]

* Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, UPRESA-CNRS 8016, FR
CNRS 1818, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, FRANCE.

† Institut Agro-Alimentaire de Lille (IAAL) Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq
cedex, FRANCE.

‡ Unité de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, B-1348 Louvain la
Neuve, BELGIUM.

Corresponding author Pascal Touzet

Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales

UPRESA CNRS 8016 - Bâtiment SN2 -Université de Lille I

F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, FRANCE

Tel: 33 3 20 43 40 24

Fax: 33 3 20 40 69 79

E-mail: pascal.touzet@univ-lille1.fr

Manuscript information:

Number of text pages: 27 pages

7 figures

Word and character counts

Abstract, 184 words

Paper 46867 characters

Abbreviations footnote

NAD, nicotinamide-adenine-dinucleotide

COX, cytochrome *c* oxidase

CMS, cytoplasmic male sterility

AOX, alternative oxidase

Data deposition footnote

The *Gcox2*, *Gnad9-1*, *Gnad9-2* sequences have been deposited in the Genbank database.

Accession numbers:

***Gcox2*: AF276430**

***Gnad9-1*: AF276428**

***Gnad9-2*: AF276429**

ABSTRACT

Cytoplasmic male sterility (CMS) in higher plants has been mainly studied in cultivated species. In most cases, pollen abortion is linked to the presence of an additional mitochondrial polypeptide leading to organelle dysfunction in reproductive tissues. In wild beet, both CMS and hermaphrodite plants coexist in natural populations. The *G* cytoplasm is widely distributed along the Western European coast, and previous genetic studies have demonstrated that this cytoplasm confers male sterility in beet. In the present study, we have identified two mutations of *G* mitochondrial genes each of which results in the production of a respiratory chain complex subunit with an altered molecular weight; the NAD9 subunit has a C-terminal extension while the COX2 subunit has a truncated C-terminus. NADH dehydrogenase activity was unchanged, but cytochrome *c* oxidase activity was reduced by 50% in leaves. Moreover, Western blot analyses revealed that alternative oxidase was more highly expressed in male sterile *G* plants than in a fertile control (*Nv*), suggesting that this alternative pathway might compensate for the cytochrome *c* oxidase deficiency. Implications of respiratory chain changes and a putative link with CMS are discussed.

INTRODUCTION

The main function of mitochondria in eukaryotic organisms is the production of energy via the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation. The electrochemical gradient produced by proton translocation through the mitochondrial inner membrane is used in ATP production by the mitochondrial ATP synthase. As oxidative phosphorylation supplies most of the cellular ATP, changes in the respiratory chain are very deleterious to the organism. Plant mitochondria have several characteristics. For instance, they contain additional NAD(P)H dehydrogenases and a cyanide-resistant pathway in the respiratory chain. The plant mitochondrial genome is specific in that it contains large non-coding fragments and several open reading frames, and has high recombinational activity.

Cytoplasmic male sterility (CMS), a particular mitochondrial dysfunction linked to a mutation of the mitochondrial genome, has been seen in over 150 plant species (1-3). It is a maternally inherited trait that leads to pollen development abortion without affecting the vegetative developmental stages of the plant. Fertility can be phenotypically restored by a nucleus with appropriate restorer genes. Because of its agronomic interest, the molecular mechanism of CMS has been identified and characterized in several cultivated species, such as maize (4), petunia (5), sunflower (6), common bean (7), and *Brassica* (8, 9). In most cases, male sterility is linked to a mitochondrial dysfunction associated with the presence of an additional chimeric gene coded by the mitochondrial genome (reviewed in 10). The male-sterile T (Texas)-cytoplasm of maize is one of the best understood cases. The chimeric *T-urf13* gene encodes a 13 kDa pore-forming protein which is assembled as an oligomer in the mitochondrial inner membrane (11). During flowering, aerobic fermentation results in increased acetaldehyde production in the male reproductive tissues and the toxic effects of acetaldehyde accumulation on mitochondria,

weakened by the presence of the URF13-porin, might lead to organelle breakdown in tapetum cells and thus to male gametogenesis abortion (12).

In a few species, the mitochondrial dysfunction leading to male sterility can be linked more directly to a respiratory chain disorder specific to the tissues involved in male gametogenesis. For example, in sorghum CMS, subunit 6 of the mitochondrial ATP synthase (*atp6*) seems to be involved in male sterility (13). Whereas editing of CMS-*atp6* transcripts in the anther is strongly reduced compared to that in fertile plants, RNA editing of these transcripts increases following fertility restoration (14). In rice, an additional copy of *atp6* (*B-atp6*) in CMS cytoplasm seems to be involved in the expression of the male sterile phenotype (15). Restoration of male fertility is associated with increased editing and processing of *B-atp6* transcripts (16). Although there is no definitive evidence linking pollen disruption and the respiratory chain dysfunctions, the involvement of these aberrations in male sterility is strongly suggested, as they are restricted to the male reproductive organs.

In sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*), the best studied CMS is the *Owen* type. This cytoplasm has been used worldwide for decades in breeding programs as a unique source of CMS (17). Although a restoration effect has been described on *coxI* transcripts in bud flowers (18), the mechanism inducing pollen abortion remains unclear. New CMS sources can be obtained from natural populations of sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) (19). The male-sterile *G* cytoplasm (also called *R*) was first identified in 1970 in the Canche estuary (Northern France) and was introduced as an alternative CMS in sugar beet breeding programs (20). Population genetics studies have revealed that this male sterile cytoplasm is widely spread in wild beet populations; this has been documented on the French coast (19), and, more recently, of the rest of Western Europe (21).

In this study we present a molecular study of CMS *G* and show that it exhibits two modified respiratory chain complex subunits: NAD9 and COX2. While NADH dehydrogenase activity is unchanged, cytochrome *c* oxidase activity is reduced in sterile *G* plants. We believe that this peculiar cytoplasm is the first described plant mitochondrial mutant affecting the respiratory chain to be maintained in natural populations.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The two sugar beet lines used were provided by INRA (Dijon, France). They constitute a near nuclear isogenic pair and differ in their cytoplasm, which is *G* for the male-sterile line and *Nv* (*Normal vulgaris*) for the maintainer line. The donor parent of the *G* cytoplasm is a male-sterile *Beta vulgaris* ssp. *maritima* derived from seeds harvested in 1989 from an open pollinated male-sterile plant in a wild population in Saint-Nazaire (Brittany, France). The line bearing the *G* cytoplasm results from 6 successive backcrosses with the recurrent parental line, INRA 660. The reference fertile cytoplasm, *Nv* (also called *TK81-O* (22)), is that most frequently used in sugar beet breeding programs. Plants were grown to an age of 2-4 months in a greenhouse under standard conditions (20°C; 16 hours light).

Mitochondrial protein synthesis

Mitochondria were isolated under sterile conditions from young leaves by centrifugation on a Percoll gradient and labeled *in organello* with [³⁵S]methionine according to the method described by Boutry *et al.* (23). For pulse-chase experiments, after 7 min of *in organello* labeling in 100 μl

of synthesis medium, 10 μ l of 25 mM unlabeled methionine was added and incubation continued for 40 min.

Protein gel electrophoresis and Western blotting

In organello labeled mitochondria (30,000-40,000 cpm) were subjected to electrophoresis on 12-17% SDS gels, electroblotted onto nitrocellulose membrane, and autoradiographed. For Western blotting, the amount of mitochondrial protein electrophoresed was 5 μ g when using antisera against maize COX2 (24) or wheat NAD9 (25) and 100 μ g when using a monoclonal antibody against *Sauromatum guttatum* alternative oxidase (26). For blue native gels, 200-300 μ g of proteins were used, following the protocol described by Jänsch *et al.* (27); for the second dimension, the blue native gel was incubated for 3 x 30 min in denaturation buffer (80 mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.005% bromphenol blue, 1.5% dithiothreitol, pH 6.8), then regions containing mitochondrial complexes stained with Coomassie blue were cut out of the gel, placed above the stacking gel of a standard 15% SDS-PAGE gel, and sealed in position with melted 1% agarose in 50 mM Tris, 400 mM glycine, 2.5 mM EDTA, pH 7.0.

Protein N-terminal microsequencing

Proteins separated on two-dimensional blue native /SDS PAGE and electroblotted onto a PVDF membrane were sequenced by automated Edman degradation on an Applied Biosystems pulsed liquid-phase sequencer (model 477A).

DNA cloning and sequencing

The sequence of *Gcox2* was determined by direct sequencing of the PCR product using specific infra-red detection (IRD)-labeled primers on a Li-Cor automated DNA sequencer 4000L. For *nad9*, inverse-PCR using internal primers was performed on *Hind*III-digested and religated DNA (28, 29). The amplified fragments were cloned using the pGEM-T Vector Cloning System (Promega), and sequenced. Specific primers were then defined for each copy of *nad9*. The products of three independent PCR were sequenced per gene.

Southern blotting

DNA isolation and hybridization were performed as described by Saumitou-Laprade *et al.* (30). Homologous *nad9* and *cox2* probes were produced by PCR and labeled using the Boehringer PCR DIG labeling mix.

Northern blotting

Total RNA was isolated from green leaves in the presence of aurintricarboxylic acid (31). Transcripts were hybridized with the *cox2*-exon 1 or *nad9* probes obtained by PCR and labeled with [³²P]dNTP.

Enzymatic activity assay

Cytochrome *c* oxidase activity was monitoring at 550 nm the oxidation of 0.1% (w/v) reduced cytochrome *c* in 40 mM NaH₂PO₄, 0.1% *n*-dodecylmaltoside, 1 mM EDTA, pH 7.2. NADH dehydrogenase activity was measured by monitoring at 550 nm the reduction of 0.1% cytochrome *c* in 40 mM NaH₂PO₄, 0.1% *n*-dodecylmaltoside, 1 mM EDTA, 1 mM KCN, 2.5 mM NADH, pH 7.2. NADH:ubiquinone oxidoreductase was specifically inhibited by the addition of

60 μ M rotenone (32). Measurements began after addition of 10 or 50 μ g of submitochondrial particles for the cytochrome c oxidase assay or NADH dehydrogenase assay, respectively.

RESULTS

***In organello* labeling of mitochondrially encoded proteins.** Following *in organello* ³⁵S-labeling of isolated mitochondria, SDS-PAGE and autoradiography clearly revealed the presence of three variant labeled products in the *G* cytoplasm (Fig. 1A). No additional or missing bands were found in the sterile cytoplasm. The molecular weights and intensities of the variant proteins suggested a relationship between these three *G* variants and three *Nv* labeled products (respective apparent molecular weights: *Nv* 25, 32, and 34 kDa; *G* 27, 31, and 33 kDa). Pulse-chase labeling showed that, after chase, the intensity of the 34 kDa (*Nv*) and 33 kDa (*G*) bands decreased markedly, while that of the 32 kDa (*Nv*) and 31 kDa (*G*) bands increased (Fig. 1B), suggesting that the 34 and 33 kDa bands could be precursors, respectively, of the 32 and 31 kDa proteins.

Identification of the Labeled Variant Proteins. In beet, subunit 2 of the cytochrome *c* oxidase (COX2) is encoded by the mitochondrial genome (22) and is translated as a precursor (preCOX2), which is cleaved at its N-terminus during assembly of the complex (33). The molecular weights for preCOX2 and mature COX2 predicted from the DNA sequence are 29.5 and 27.8 kDa, respectively. The pulse-chase experiment above strongly suggested that the 34 and 33 kDa labeled products are precursors of the 32 and 31 kDa proteins, respectively, leading us to think that the 32 kDa (*Nv*) and 31 kDa (*G*) polypeptides may be COX2, a hypothesis confirmed by Western blotting using anti-COX2 antiserum (Fig. 1C).

When probes for *nad6*, *cox3*, *atp6*, and *nad9* mitochondrial genes encoding 20-30 kDa polypeptides, were used in Southern blotting experiments, only the *nad9* probe gave a pattern which differed between the two cytoplasms (data not shown). The predicted size of subunit 9 of NADH:ubiquinone oxidoreductase (NAD9) is 23 kDa (34), and, in the plant, NAD9 has an apparent molecular weight of about 25-30 kDa on SDS-PAGE (25). Western blotting of a beet

mitochondrial fraction using anti-NAD9 antiserum revealed that the 25 kDa (*Nv*) and 27 kDa (*G*) labeled products corresponded to NAD9 (Fig. 1D).

These experiments show that the *G* COX2 subunit is smaller than the corresponding *Nv* product, while the converse holds for the NAD9 subunit.

Southern blot analysis of *cox2* and *nad9*. Southern blotting of total DNA digested with *EcoR* I using a *cox2* probe revealed two bands in both cytoplasms (Fig. 2A, left). In the *Nv* cytoplasm, bands of 1.5 kb and 2 kb corresponded, respectively, to the 5' and 3' *cox2* extremities. This pattern has been previously described in several species and subspecies in the genus *Beta* (35). CMS *G* shares the 6.8 kb fragment (*cox2* 5' extremity) with the *Owen* CMS cytoplasm (22), but the 2.8 kb fragment seen is specific to *Gcox2* and presumably corresponds to the 3' extremity. These results suggest that both extremities of the *Gcox2* gene are rearranged in the sterile *G* cytoplasm compared to *Nv*. *Xba*I digestion indicated that the *cox2* gene is present as a single copy in both cytoplasms (Fig. 2A, right).

Southern blotting using an *nad9* probe indicated that, in the *G* cytoplasm, *nad9* is present as two copies (Fig. 2B). This conclusion was confirmed by *Hind*III and *Xho*I digestions (data not shown). In all cases, one copy of *G nad9* was found on a fragment that was about 0.4 kb shorter than that bearing the *Nv nad9*.

Sequence analysis. In beet, the *cox2* gene consists of two exons coding for a 260 amino acid protein (22). In the present study, the *G cox2* sequence obtained by PCR revealed 4 single point mutations in the intron and 1 in exon 2, in which the TTA codon encoding leucine²⁵³ was changed to the STOP codon, TGA. As a result, the *G* COX2 subunit does not contain the 8 C-terminal amino acid residues, which are highly conserved in dicotyledonous species and include

leucine²⁵³, which is conserved across several distant species (Fig. 3). The loss of these 8 amino acid residues explains the size difference between *Nv* and *G* COX2 on Western blots.

The two copies of *nad9* in the *G* cytoplasm (*Gnad9-1* and *Gnad9-2*) were cloned by PCR and sequenced (Fig. 4A). Compared with *Nv nad9*, 10 single point mutations, 5 of which resulted in amino acid substitutions, were found in *Gnad9-1*. One of these resulted in the substitution of leucine for phenylalanine¹⁷⁵, which is part of a highly conserved motif (QEFR) in NAD9 polypeptides. A T/G substitution of the *nad9* STOP codon resulted in extension of the coding sequence by 14 codons (Fig. 4B). This gene was fused at its 3' extremity with an 80 bp fragment sharing 95% homology with the 5' extremity of the beet *atp9* gene (36). An 11 nucleotide stretch, common to *nad9* and *atp9*, is probably involved in this recombination. Furthermore, a 50 bp fragment, 92% homologous with the *coxI* gene (18), was found 122 bp downstream of the *Gnad9-1 orf*.

The *Gnad9-2* copy shared the same point mutations with *Gnad9-1* (Fig. 4A), suggesting that the duplication of this gene occurred following mutations. *Gnad9-2* had the same genomic organization as *Nv nad9* (37) except for a 390 bp deletion in the 3' extremity that includes the NAD9 C-terminus coding sequence. This 390 bp sequence is directly flanked by two short repeat sequences (5'-TCGATT-3'), probably involved in the rearrangement leading to its deletion. The new *orf* putatively encodes a shorter 21.7 kDa polypeptide. Given the size of 25 kDa for *Nv* NAD9 as determined by Western blotting, the larger NAD9 (27 kDa) found in the *G* cytoplasm must correspond to the *Gnad9-1* product. No shorter product corresponding to *Gnad9-2* was seen.

Northern blot analysis of the *cox2* and *nad9* transcripts. Northern blotting using a *cox2*-exon1 probe revealed the presence of a single transcript in the *Nv* and *G* cytoplasm, the *Gcox2*

transcript being 0.6 kb larger than the *Nv cox2* transcript (Fig. 5A). This was not surprising, since Southern blotting showed that modification occurred around this gene in *G* cytoplasm.

Although two copies of *nad9* were found in *G* cytoplasm, Northern blotting revealed only a single transcript which most probably corresponds to *Gnad9-1* (Fig. 5B), since *Gnad9-2* would encode a smaller, rather than a larger polypeptide product. The *Gnad9-2* gene therefore seems not to be expressed at a detectable level, possibly as a result of the 390 bp deletion in its 3' region which could destabilize the transcript (38). Interestingly, *G nad9* mRNA is 4 times larger than *Nv nad9* mRNA, suggesting possible co-transcription of *Gnad9* with another mitochondrial gene, as is occasionally the case, for instance, in wheat (39).

Separation of mitochondrial complexes on blue native gels. The NAD9 and COX2 subunits belong, respectively, to complexes I and IV of the mitochondrial respiratory chain. These complexes were separated on blue native gels (Fig. 6A), giving a pattern similar to that described for potato mitochondria (27). Complex I was found to be present in both the *G* and *Nv* cytoplasms. When this band was further analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-NAD9 antiserum, the variant NAD9 was clearly identified as part of the complex (Fig. 6B and C). In contrast, complex IV was only seen in the *Nv* cytoplasm. Its identification was confirmed by N-terminal microsequencing of a 32 kDa polypeptide obtained after separation by second dimension SDS-PAGE which gave a sequence corresponding to the first 10 amino acids of the mature form of the beet COX2 subunit (data not shown). These results suggest that the *G* complex IV is unstable under the conditions used for solubilization and/or blue native gel electrophoresis.

Enzymatic activity assays. No consistent differences could be detected in the NADH dehydrogenase activity of submitochondrial particles from *Nv* and *G* cytoplasms and, in both cases, the activity was inhibited by 25% by rotenone (40) (Fig.7A). However, assay of cytochrome *c* oxidase (complex IV) revealed that the activity of this complex was reduced by 50% in the *G* cytoplasm compared to *Nv*, and that, in both cytoplasms, cytochrome *c* oxidase activity was totally inhibited by 1 mM KCN (Fig. 7B); when the assay was carried out in the presence of the 1.5% *n*-dodecylmaltoside and 500 mM aminocaproic acid used in the blue native gel sample buffer, although the overall activity was lower, this same 50% difference in activity was still seen (data not shown), indicating that cytochrome *c* oxidase integrity was probably lost during the actual blue native gel electrophoresis, rather than during solubilization in the sample buffer.

Alternative oxidase Western blotting. Given the reduced activity of the cytochrome *c* oxidase in *G* cytoplasm, we wondered whether alternative oxidase (AOX), an alternative ubiquinone electron acceptor, might be up-regulated. As show in Fig. 7C, Western blotting revealed the presence of two AOX subunits in beet leaves, with the 32 kDa subunit being present in similar amounts in both cytoplasms and the 34.5 kDa subunit being more highly expressed in *G* than in *Nv*. The existence of two AOX subunits of different sizes in leaves has already been documented in several species (26, 41).

DISCUSSION

Alteration of respiratory chain integrity generally causes serious damage to the plant. We have identified mutations of the *nad9* and *cox2* genes of the CMS *G* cytoplasm in wild beet that result in the production of modified proteins that belong to complex I and IV, respectively. These two mitochondrial complexes have previously been shown to be altered in some cytoplasm. Alloplasmic wheat with a reduced amount of *coxI* transcript is characterized by reduced growth and partial male sterility (42). In maize, in which deletions in the *cox2* gene have been described in the NCS5 (43) and NCS6 (44) mutants, the COX2 subunit is not expressed in the mutated mitochondria and complex IV is therefore non-functional and plants can survive only through heteroplasmy. Several mitochondrial mutations affecting complex I have also been characterized in maize (45) and tobacco (46, 47) leading to impaired developmental stages and modified mitochondrial and cellular metabolism.

In all these cases, mutations result from mitochondrial DNA rearrangements and are associated with abnormal development. However, in *G* cytoplasm the modified size of COX2 and NAD9 was a direct result of DNA single point mutations, which is most unusual. Discrete mutations leading to complexes that are still active might explain why the male sterile *G* plants do not exhibit abnormal development and are maintained in natural populations.

The *G* complex I containing the mutated NAD9 subunit remains functional at the vegetative stage. Complex I is "L" shaped and is integrated in the mitochondrial inner membrane with its peripheral arm in the matrix (48). In several plant species, it is made up of more than 30 subunits (32, 40, 49), the function of most of which are unknown. The NAD9 subunit is mitochondrially encoded in plants (25) and is part of the peripheral arm. In the present study, the *G nad9* DNA

sequence was found to contain 10 mutations that do not correspond to editing sites (34), but, instead, result in 5 amino acid substitutions and C-terminus extension. Although some residue changes occurred in highly conserved motifs in NAD9, these changes had no effect on either complex I assembly or NADH dehydrogenase activity. However, we cannot exclude the possibility that these mutations may affect an undetermined complex I function linked to NAD9.

Cytochrome *c* oxidase properties are modified in *G* mitochondria. Plant complex IV is composed of 10 subunits (27). The COX1 and COX2 subunits constitute the core of the enzyme in which oxido-reduction reactions and proton transfer occur (50). In *G* COX2, the normally highly conserved 8 C-terminal residues are lost. According to the crystallographic structure of beef cytochrome *c* oxidase (51), the COX2 C-terminus is localized in the intermembrane space of the mitochondrion and it is here that cytochrome *c* binds to the complex and electrons are transferred to the active site via Cu_A and cytochrome *a* (reviewed in 52). Although the *G* complex IV was not observed on blue native gels, the complete inhibition of cytochrome *c* oxidation by cyanide showed that the 50% reduced activity could be attributed to complex IV. The observation that the amount of immunodetected COX2 protein was not reduced in *G* cytoplasm suggests that the lower cytochrome *c* oxidase activity is due to a qualitative defect, rather than to reduced synthesis of COX2. Thus, the presence of the modified COX2 does not lead to total complex inactivation or breakdown. The loss of 8 amino acids at the C-terminus of COX2 might locally modify complex IV conformation and/or its affinity for cytochrome *c* and lead to reduced activity and complex instability during electrophoresis.

The reduced cytochrome *c* oxidase activity might explain the increased expression of alternative oxidase. In plants, alternative oxidase is encoded by a small gene family. Three to

four different subunits have been described in different species (41, 53) and form AOX homo- or hetero-dimers (54). Differential tissue-specific and/or stress-induced expression of AOX genes has been reported (reviewed in (55)). In the present study, we identified two subunits (32 and 34.5 kDa) in beet leaves and found that the 34.5 kDa subunit was more highly expressed in *G* cytoplasm than in *Nv* cytoplasm (Fig. 7C). In the plant respiratory chain, ubiquinone, generated by complexes I and II and internal and external NAD(P)H dehydrogenases, can be oxidized via cytochrome *c* or alternative pathways. In *G* mitochondria, diverting the electron flux from the cytochrome *c* pathway to the over-expressed alternative oxidase may compensate for the reduced cytochrome *c* oxidase activity. Moreover, as alternative oxidase is not coupled to phosphorylation, we can hypothesize that the tricarboxylic acid cycle and/or glycolysis might compensate for a deficiency in respiratory chain ATP production as a result of reduced complex IV activity at the vegetative stage. However, the role of this alternative pathway is not fully understood and many factors are involved in its regulation (55). Recently, cytochrome *c* oxidase-defective mutants of the fungus, *Podospora anserina*, revealed a possible link between alternative oxidase and senescence in terms of the prevention of the production of reactive oxygen species (ROS) by complex III (56). An increase in alternative oxidase and decrease in cytochrome *c* oxidase activity might result in less ROS production (57), and protect mitochondrial metabolites and genetic information against oxidative stress during plant life (58). According to our observations, this particular electron partitioning in *G* beets does not seem to affect plant development, except possibly for the male reproductive trait, and may contribute to a selective advantage of this cytoplasm under given environmental conditions.

Are the modified *cox2* and *nad9* involved in *G* cytoplasmic male sterility? Several lines of evidence suggest that plant male gametogenesis requires high mitochondrial activity (59-61).

Moreover, mitochondrial mutations that affect respiratory chain performance disturb plant development and are strongly associated with impaired gametogenesis. Several hypotheses can be put forward for a putative link between modified respiratory complexes and CMS:

- We are not able to attribute any enzyme dysfunction at the vegetative stage to mutated NAD9. Since respiratory chain subunits (61, 62) and regulation of mitochondrial gene expression (60) can be anther-specific, we cannot exclude the possibility that *G* complex I impairment is limited to reproductive tissues. Indeed, the role of subunit 9 remains unknown and various complex I alterations are strongly associated with pollen production deficiency (reviewed in (63)). Moreover, in *Neurospora* deletion of the *nuo30.4* gene (the fungal *nad9* homologue) resulted in failure of assembly of the peripheral arm of complex I, while rotenone-sensitive NADH dehydrogenase activity remained unchanged. Interestingly, these mutants showed good vegetative growth, but failed to produce ascospores (64).
- In the vegetative stage, reduced cytochrome *c* oxidase activity can be compensated for by increased glycolysis and AOX activity. However, this second pathway does not contribute to the transmembrane potential and thus ATP production. In contrast to the situation in vegetative tissues, the high ATP/ADP ratio required for pollen development (65) may not be achieved in flower buds with the *G* cytoplasm, resulting in male sterility. For example, in transgenic potatoes containing complex I 55 kDa subunit antisense DNA in which the amount of this protein was reduced by 50%, vegetative growth was unchanged, but pollen maturation was markedly affected, and the authors suggested that this might be due to insufficient respiratory chain activity (66).
- We cannot exclude the hypothesis that smaller COX2 and larger NAD9 are both required for the expression and/or maintenance of this CMS in natural populations. Both modified subunits are indeed associated in all accessions of *G* cytoplasm encountered in natural

populations (unpublished data). Moreover, none of the 20 different mitotypes characterized in the beets of Western Europe (21) contain the smaller COX2 or larger NAD9 specific to *G*.

Until now, alterations in plant mitochondria respiratory chain have been studied by analysis of mutants which would be unable to survive in natural conditions as a result of the developmental changes. To the best of our knowledge, the present study is the first to describe a plant mitochondrial mutant affecting the respiratory chain in which vegetative growth is not affected and which is maintained in natural populations. Moreover, since this CMS has been identified in various beet populations in Western Europe, we assume that the mutations described in this paper are not deleterious to the plants, except perhaps for the male reproductive trait. Interestingly enough, restored CMS *G* plants coexist with male sterile plants in beet populations. This material will be useful in studying the male sterility mechanism and putative selective advantages of the metabolic changes under natural selection. Finally, this study opens up fields of investigation for metabolism diversity encountered in natural populations.

We thank J. Cuguen for his helpful comments on manuscript, I. Small, J.-M. Grienenberger and T. Elthon for gifts of antibodies, and H. Degand for protein sequencing. This work was supported by grants from Région Nord-Pas de Calais, FEDER, the Tournesol Programme (Belgium/France) and a CNRS-FNRS International Cooperation Program, and from the Belgian National Fund for Scientific Research and the Interuniversity 'poles of attraction' program of the Belgian Government Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs. E. D. received fellowships from the European Community (PTP142 and the ESF Plant Adaptation Program) and the University of Lille I (BQR).

LEGENDS

Figure 1. Analysis of variant mitochondrial products. **A** Autoradiogram of *in organello* labeled polypeptides. Newly synthesized mitochondrial proteins, labeled *in organello* with [³⁵S]methionine were analyzed by 12-17% SDS-PAGE, electroblotted onto an Immobilon-P membrane, and autoradiographed. The arrowheads indicate size variants. **B** Pulse-chase labeling of mitochondria. Mitochondria were labeled *in organello* for 7 min, then chased (lanes 2 and 4) or not chased (lanes 1 and 3) for 40 min with 2.5 mM cold methionine. The filled circles (●) indicate variant bands and the empty circles (○) bands the intensity of which decreased during chase. **C** Western blots using anti-COX2 antiserum. **D** Western blots using anti-NAD9 antiserum.

Figure 2. Southern blotting of total DNA from *Nv* and *G* plants using *cox2* or *nad9* probes. Total DNA (20 μg) was digested with the indicated enzymes, electrophoresed, and transferred to a nylon membrane (Hybond N) for Southern blotting with a *cox2* (**A**) or *nad9* (**B**) probe. The molecular weights of the bands are indicated in kb.

Figure 3. Amino acid sequence alignment of the predicted C-terminal sequence of COX2 from various species. Identical amino acids are shown in gray. The vertical arrow indicates the premature stop codon in *G* COX2. The highly conserved leucine²⁵³ is shown in bold. The sequences are numbered from the first amino acid residue of beet COX2.

Figure 4. Genomic organization of the *Nv* and *G nad9* genes. **A.** Diagram showing the genomic clones. The nucleotides are numbered from the translation initiation codon of *nad9*. The vertical

arrows indicate single point mutations in *G* compared to the *TK81-O* sequence (36). The horizontal brackets (┌┐) indicate DNA segments homologous to *atp9*, *coxI*, or chloroplast DNA. The *Gnad9-2* deletion is indicated by the dotted lines, the horizontal arrowheads indicating 6 bp short repeats. The boxes labeled P, W, and G represent the chloroplast *trnP-trnW-petG* gene cluster. **B** Nucleotide and predicted amino acid sequences at the *nad9* and *Gnad9-1* C-termini. Predicted translated nucleotides are shown in upper cases. Mutated nucleotides are underlined. The asterisk (*) indicates a stop codon. Additional amino acids in *Gnad9-1* are shown in bold. The open box represents 11 nucleotides common to *Gnad9-1*, *nad9* and *atp9* genes.

Figure 5. Northern blotting of *cox2* and *nad9* genes. RNA (10 µg) was electrophoresed, transferred, and hybridized with the *cox2*-exon1 probe (A) or the *nad9* probe (B).

Figure 6. Analysis of mitochondrial protein complexes by blue native PAGE. **A.** Mitochondrial complexes were solubilized using *n*-dodecylmaltoside, electrophoresed on a 5-12% blue native polyacrylamide gel, and the proteins stained with Coomassie blue. The arrowheads indicate respiratory chain complexes. **B.** Subunits of complex I separated on the blue native gel in A were analyzed in a second dimension on SDS-PAGE, and silver stained. The arrowhead indicates the 25 kDa subunit. **C.** A gel similar to that shown in B analyzed by Western blotting using anti-NAD9 antiserum.

Figure 7. Enzymatic activity of mitochondrial complexes. A NADH dehydrogenase activity was determined by recording cytochrome *c* reduction at 550 nm, as described in the Material and Methods, with NADH as substrate in the presence of KCN (100% value, 0.28 ± 0.036

$\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$). In the two right-hand lanes, 60 μM rotenone was added to specifically inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase. **B** Cytochrome *c* oxidase activity was monitored by recording the oxidation of cytochrome *c* at 550 nm (100% value, $2.7 \pm 0.19 \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$). In the two right-hand lanes, 1 mM KCN was added. **C** Mitochondrial proteins (100 μg) were electrophoresed and analysed by Western blotting using anti-alternative oxidase antiserum.

REFERENCES

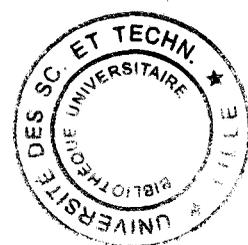
1. Laser, K. D. & Lersten, N. R. (1972) *Bot. Rev.* **38**, 425-454.
2. Mackenzie, S., Shichuan, H. & Lyznik, A. (1994) *Plant Physiol.* **105**, 775-780.
3. Levings III, C. S. & Vasil, I. K. eds (1995) *The Molecular Biology of Plant Mitochondria* (Kluwer).
4. Dewey, R. E., Timothy, D. H. & Levings III, C. S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5374-5378.
5. Nivison, H. T. (1989) *Plant Cell* **1**, 1121-1130.
6. Horn, R., Köhler, R. H. & Zetsche, K. (1991) *Plant Mol. Biol.* **7**, 29-26.
7. Johns, C., Lu, M. Q., Lyznik, A. & Mackenzie, S. (1992) *Plant Cell* **4**, 435-449.
8. Grelon, M., Budar, F., Bonhomme, S. & Pelletier, G. (1994) *Mol. Gen. Genet.* **243**, 540-547.
9. Singh, M. & Brown, G. G. (1993) *Curr. Genet.* **24**, 316-322.
10. Schnable, P. S. & Wise, R. P. (1998) *Trends Plant Sci.* **3**, 175-180.
11. Levings III, C. S. (1993) *Plant Cell* **5**, 1285-1290.
12. Tadege, M. & Kuhlemeier, C. (1997) *Plant Mol. Biol.* **35**, 343-354.
13. Howad, W. & Kempken, F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11090-11095.
14. Pring, D. R., Tang, H. V., Howad, W. & Kempken, F. (1999) *J Hered* **90**, 386-393.
15. Akagi, H., Sakamoto, M., Shinjyo, C., Shimada, H. & Fujimura, T. (1994) *Curr. Genet.* **25**, 52-8.
16. Iwabuchi, M., Kyojuka, J. & Shimamoto, K. (1993) *EMBO J.* **12**, 1437-1446.
17. Owen, F. V. (1945) *J. Agr. Res.* **71**, 423-440.
18. Kubo, T., Nishizawa, S. & Mikami, T. (1999) *Mol. Gen. Genet.* **262**, 283-290.

19. Cuguen, J., Wattier, R., Saumitou-Laprade, P., Forcioli, D., Mörchen, M., Van Dijk, H. & Vernet, P. (1994) *Genet. Sel. Evol.* **26**, 87-101.
20. Saumitou-Laprade, P., Rouwendal, G. J. A., Cuguen, J., Krens, F. A. & Michaelis, G. (1993) *Theor. Appl. Genet.* **85**, 529-535.
21. Desplanque, B., Viard, F., Bernard, J., Forcioli, D., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J. & Van Dijk, H. (2000) *Mol. Ecol.* **9**, 141-154.
22. Senda, M., Harada, T., Mikami, T., Sugiura, M. & Kinoshita, T. (1991) *Curr. Genet.* **19**, 175-181.
23. Boutry, M., Faber, A.-M., Charbonnier, M. & Briquet, M. (1984) *Plant Mol. Biol.* **3**, 445-452.
24. Kumar, R., Lelu, M.-A. & Small, I. (1995) *Plant Cell Reports* **14**, 534-538.
25. Lamatina, L., Gonzalez, D., Gualberto, J. & Grienenberger, J. M. (1993) *Eur. J. Bioch.* **217**, 831-838.
26. Elthon, T. E., Nickels, R. L. & McIntosh, L. (1989) *Plant Physiol.* **89**, 1311-1317.
27. Jansch, L., Krufft, V., Schmitz, U. K. & Braun, H. P. (1996) *Plant J.* **9**, 357-368.
28. Ochman, H., Gerber, A. S. & Hartl, D. L. (1988) *Genetics* **120**, 621-623.
29. Triglia, T., Peterson, M. G. & Kemp, D. J. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 81-86.
30. Saumitou-Laprade, P., Pannenbecker, G., Boutin-Stadler, V., Michealis, G. & Vernet, P. (1991) *Theor. Appl. Genet.* **81**, 533-536.
31. Stern, D. B. & Newton, K. J. (1986) *Methods Enzymol.* **118**, 488-496.
32. Leterme, S. & Boutry, M. (1993) *Plant Physiol.* **102**, 435-443.
33. Herrmann, J. M., Koll, H., Cook, R. A., Neupert, W. & Stuart, R. A. (1995) *J. Bio. Chem.* **270**, 27079-27086.
34. Kubo, T., Mikami, T. & Kinoshita, T. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **241**, 479-482.

35. Senda, M., Onodera, Y., Kinoshita, T. & Mikami, T. (1995) *Theor. Appl. Genet.* **90**, 914-919.
36. Xue, Y. B., Thomas, C. M. & Davies, D. R. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 8857.
37. Kubo, T., Yanai, Y., Kinoshita, T. & Mikami, T. (1995) *Curr. Genet.* **27**, 285-289.
38. Stern, D. B., Radwanski, R. & Kindle, K. L. (1991) *Plant Cell* **3**, 285-297.
39. Gualberto, J. M., Bonnard, G., Lamattina, L. & Grienenberger, J. M. (1991) *Plant Cell* **3**, 1109-1120.
40. Rasmusson, A. G., Mendel-Hartvig, J., Moller, I. M. & Wiskich, J. T. (1994) *Physiol. P.* **90**, 607-615.
41. Finnegan, P. M., Whelan, J., Millar, A. H., Zhang, Q., Smith, M. K., Wiskich, J. T. & Day, D. A. (1997) *Plant Physiol.* **144**, 455-466.
42. Ikeda, T. M. & Tsunewaki, K. (1996) *Curr. Genet.* **30**, 509-514.
43. Newton, K. J., Knudsen, C., Gabay-Laughnan, S. & Laughnan, J. R. (1990) *Plant Cell* **2**, 107-113.
44. Lauer, M., Knudsen, C., Newton, K. J., Gabay-Laughnan, S. & Laughnan, J. R. (1990) *New Biol.* **2**, 179-186.
45. Marienfeld, J. R. & Newton, K. J. (1994) *Genetics* **138**, 855-863.
46. Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Diolez, P., Degand, H., Boutry, M., Vedel, F., de Kouchovsky, Y. & de Paepe, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3436-3441.
47. Lelandais, C., Albert, B., Gutierrez, S., De Paepe, R., Godelle, B., Vedel, F. & Chetrit, P. (1998) *Genetics* **50**, 873-882.
48. Hofhaus, G., Weiss, H. & Leonard, K. (1991) *J. Mol. Bio.* **221**, 1027-1043.

49. Herz, U., Schroder, W., Liddell, A., Leaver, C. J., Brennicke, A. & Grohmann, L. (1994) *J. Bio. Chem.* **269**, 2263-2269.
50. Covello, P. S. & Gray, M. W. (1990) *FEBS Letters* **268**, 5-7.
51. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Tamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136-1144.
52. Saraste, M. (1999) *Science* **283**, 1488-1493.
53. Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. & Nakazono, M. (1997) *Plant Mol. Biol.* **35**, 585-596.
54. Umbach, A. L. & Siedow, J. N. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 845-854.
55. McIntosh, L. (1994) *Plant Physiol.* **105**, 781-786.
56. Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. & Sainsard-Chanet, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4138-4143.
57. Maxwell, D. P., Wang, Y. & McIntosh, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8271-8276.
58. Wagner, A. M. & Moore, A. L. (1997) *Biosci Rep.* **17**, 319-333.
59. Lee, S.-L. J. & Warmke, H. E. (1979) *Am. J. Bot.* **66**, 141-148.
60. Smart, C. J., Moneger, F. & Leaver, C. J. (1994) *Plant Cell* **6**, 811-825.
61. Huang, J., Struck, F., Matzinger, D. F. & Levings III, C. S. (1994) *Plant Cell* **6**, 439-448.
62. De Paepe, R., Forchioni, A., Chetrit, P. & Vedel, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5934-5938.
63. Rasmusson, A. G., Heiser, V., Zabaleta, E., Brennicke, A. & Grohmann, L. (1998) *BBA* **1364**, 101-111.
64. Duarte, M., Mota, N., Pinto, L. & Videira, A. (1998) *Mol. Gen. Genet.* **257**, 368-375.
65. Bergman, P., Edqvist, J., Farbos, I. & Glimelius, K. (2000) *Plant Mol. Biol.* **42**, 531-544.

66. Heiser, V., Rasmusson, A. G., Thieck, O., Brennicke, A. & Grohmann, L. (1997) *Plant Science* 127, 61-69.



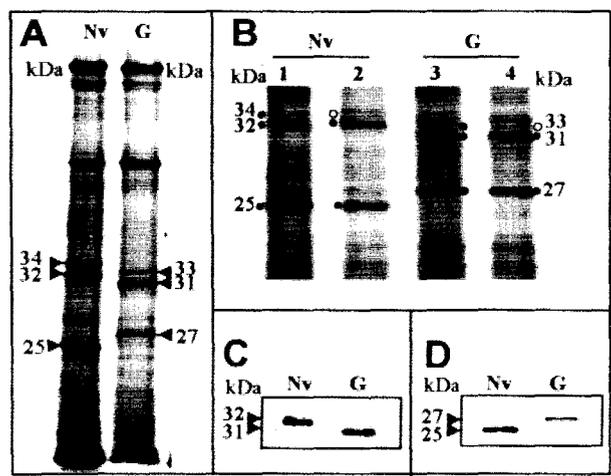


Figure 1

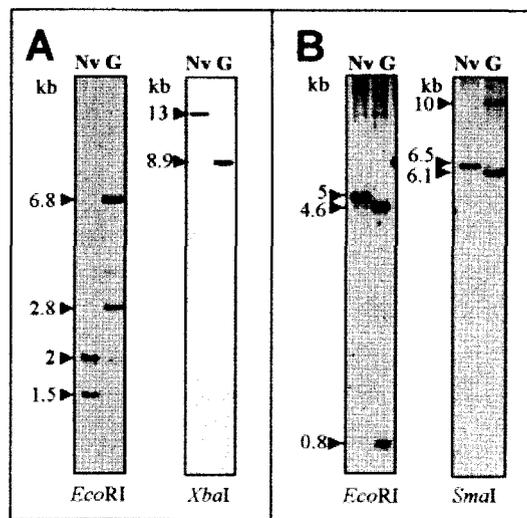


Figure 2

	250	↓	260
Seabeet CMS G	AVSRKDYGSRVSNQ		
Sugarbeet Nv	AVSRKDYGSRVSNOLIPTGEA		
Carrot	AVSRKDYGSRVSNOLIPTGEA		
Arabidopsis	AVFRKDYGSRVSNOLIPTGEA		
Radish	AVSRKDYGSWVSNOLIPTGEA		
Turnip	AVSRKDYGSWVSNOLIPTGEA		
Rice	AVTLKDYADWVSNOLIQTN		
Wheat	AVTLKDYADWVSNOLIQTN		
Maize	AVTLKDYADWVSNOLIQTN		
Liverworth	AVSLDDYVSWVSNKLD		

Figure 3

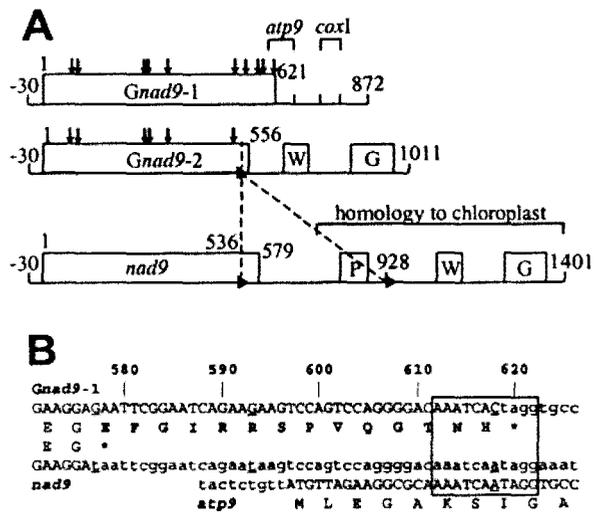


Figure 4

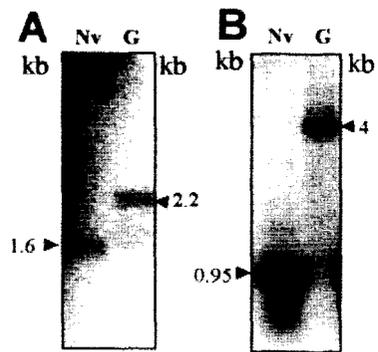


Figure 5

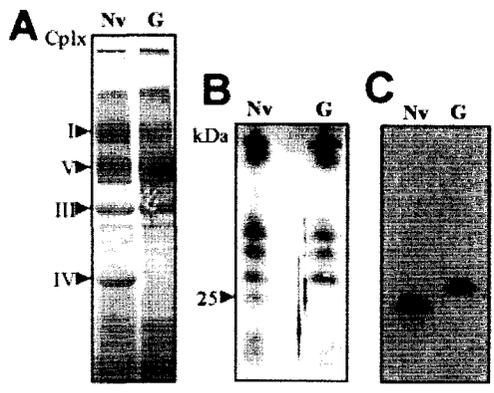


Figure 6

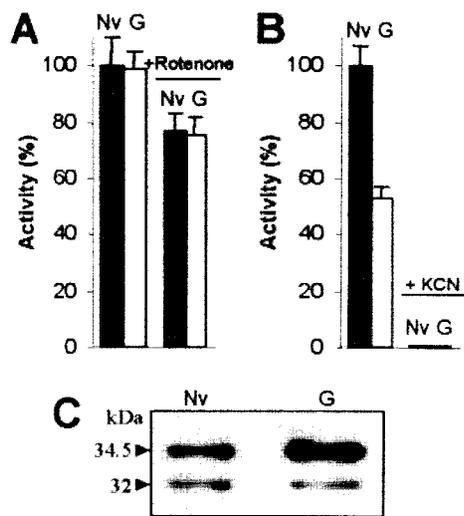


Figure 7