



N° d'ordre : 2350

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Ecole doctorale : S.E.V.A.B.

Filière : Qualité et Sécurité des Aliments

TITRE

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'UN FACTEUR D'ELONGATION
MITOCHONDRIAL LeEF-T_{smt} CHEZ LA TOMATE.
APPROCHES PAR TRANSGENESE ET PROTEOMIQUE**

par

César Luis GIRARDI

Soutenue le 26 Juin 2006
devant le jury composé de :

M. Mondheur BOUZAYEN	Président
M. Guy ALBAGNAC	Rapporteur
M. Pravendra NATH	Rapporteur
M. Jean-Claude PECH	Directeur de thèse
M. Alain LATCHE	Membre
M. Michel ROSSIGNOL	Membre
M Anne BERNADAC	Membre invité

REMERCIEMENTS

Merci au Laboratoire Génomique et Biotechnologie des Fruits en nome de son directeur Mondheur BOUZAYEN pour m'avoir accueilli pendant ces 4 ans de travail.

Je tiens à remercier et exprimer ma profonde reconnaissance à Jean-Claude PECH pour diriger cette thèse et pour m'avoir fait confiance tout au long de mes études.

Je voudrais également remercier Anne BERNADAC et Alain LATCHE pour m'avoir encadré et pour le temps, la disponibilité, l'énergie avec qui l'apprentissage était agréable.

Toute ma gratitude à Michel ROSSIGNOL pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour m'avoir soutenu dans études de spectrométrie de masse, sans oublie Gisèle BORDERIES et Carole PICHEREAUX pour ses conseils techniques et scientifiques et Mohamed ZOUINE pour la parti bioinformatique.

Je remercie Pierre MAURY pour ses conseils et sa disponibilité.

Je tiens aussi à remercier Kalina BERMUDES pour son aide avec qui j'ai passé d'agréables moments dans la paillasse du laboratoire.

Ce travail étant le fruit de nombreuses collaborations et contributions et pour ça j'exprime mes remerciements à toutes les personnes et l'ensemble des membres du laboratoire.

Je remercie les différents membres du jury et Guy ALBAGNAC et Pravendra NATH pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je voudrais remercier la CAPES pour m'avoir accordé une bourse d'étude et la Embrapa Uva e Vinho pour m'avoir dispensé de mes activités professionnel de recherche en permettant de réalisé avec tranquillité mon doctorat.

Cette thèse est dédiée à ma femme et tous les membres de ma famille qui était toujours à mon côté et pour leur soutien qui a contribué à la réussite de ce travail, et m'ont permis de garder le moral dans les moments difficiles.

SOMMAIRE

RESUME EN FRANCAIS	3
RESUME EN ANGLAIS.....	4
RESUME EN PORTUGAIS	5
BREVE PRESENTATION GENERALE ET OBJECTIFS.....	8
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	11
1-BIOSYNTHESE ET ROLE DE L'ETHYLENE.....	12
1-1- <i>Facteurs externes influant sur la synthèse d'éthylène et sur maturation.....</i>	14
1-2 <i>Les mécanismes dépendants de l'éthylène au cours de la maturation des fruits.....</i>	14
2- MECANISMES DE LA CRISE RESPIRATOIRE	15
3- FONCTIONNEMENT ET ROLE DES MITOCHONDRIES	16
4 - LE GENOME MITOCHONDRIAL ET SON EXPRESSION.....	18
5- L'IMPORTATION DES PROTEINES DANS LES MITOCHONDRIES	20
6- ROLE DE LEEF-TS _{MT} ET MECANISMES DE SYNTHÈSE DES PROTEINES CHEZ LES MITOCHONDRIES	21
7- LES STRESS OXYDATIFS ET LE ROLE DE LA MITOCHONDRIE.....	22
8- PROTEOMIQUE DE LA MITOCHONDRIE.....	24
CHAPITRE I.....	27
THE MITOCHONDRIAL ELONGATION FACTOR LEEF-TS_{MT} IS REGULATED DURING TOMATO FRUIT RIPENING AND UPON WOUNDING AND ETHYLENE TREATMENT	27
ABSTRACT	27
1. INTRODUCTION.....	28
2. MATERIALS AND METHODS	29
2.1. <i>Plant material.....</i>	29
2.2. <i>Ethylene and MCP treatment, wounding and temperature shocks.....</i>	29
2.3. <i>Phylogenetic tree.....</i>	29
2.4. <i>RNA isolation, RT-PCR and real-time PCR.....</i>	29
2.5. <i>CO₂ and ethylene production measurements.....</i>	30
2.6. <i>Generation of sense and antisense LeEF-Ts_{mt} plants</i>	30
3. RESULTS.....	31
3.1. <i>Tomato LeEF-Ts_{mt} is encoded by a single copy gene.....</i>	31
3.2 <i>LeEF-Ts_{mt} gene is expressed at higher levels in fruit and is regulated during fruit ripening.....</i>	31
3.3. <i>LeEF-Ts_{mt} gene expression is stimulated in fruit by ethylene, wounding and temperature shocks.....</i>	34
3.4. <i>Physiological characterisation of sense and antisense LeEF-Ts_{mt} plants</i>	36
4. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	39
REFERENCES	41
CHAPITRE II	44
EFFETS DE LA SUR OU SOUS-EXPRESSION DU GENE LEEF-TS_{MT} SUR LA REPONSE AUX STRESS OXYDATIFS DES PLANTES DE TOMATE	44
1. INTRODUCTION	44
2- MATÉRIEL ET MÉTHODES	46
2.1 - <i>Matériel végétal</i>	46
2.2 - <i>Application des stress.....</i>	46
2.2.1- <i>Traitement avec Paraquat.....</i>	46
2.2.2 - <i>Traitement Sécheresse.....</i>	47
2.2.3 - <i>Traitement à la Chaleur.....</i>	47
2.3 – <i>Dosage des activités enzymatiques.....</i>	47
2.3.1 - <i>Extraction et dosage des protéines.....</i>	47
2.3.2 - <i>Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD - CE 1.15.1.1).....</i>	48
2.3.3 - <i>Dosage de l'activité de la Catalase (CAT - CE 1.11.1.6).....</i>	49
2.3.4 - <i>Dosage de l'activité de la Guaiacol Peroxydase (G-POX - CE 1.11.1.7).....</i>	50
2.3.5 - <i>Dosage de l'activité de la Glutathione réductase (GR - CE 1.6.4.2).....</i>	50
3 - RESULTATS	51
3.1- <i>Expression du gène LeEF-Ts_{mt} dans les plantes transgéniques</i>	51
3.2- <i>Expression du gène LeEF-Ts_{mt} en réponse à des stress abiotiques.....</i>	52

3.3- Phénotypes des plantes de tomates sous ou sur-exprimant le gène <i>LeEF-Ts_{mt}</i> en réponse à des stress abiotiques.....	53
3.4- Effets du paraquat sur le développement de cals de tomates WT, S et AS.....	54
3.5- Effets du paraquat sur l'activité de quatre enzymes intervenant dans les processus anti-oxydatifs chez des plantes témoins (WT) évaluée à des durées variables après traitement.....	55
3.6- Activité de la catalase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.....	57
3.7- Activité de la superoxyde dismutase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.....	58
3.8- Activité de la Glutathion réductase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.....	59
3.9- Activité de la Guaïcol peroxydase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.....	60
4- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	61
4.1- Expression du gène <i>LeEF-Ts_{mt}</i>	61
4.2- Activités des enzymes en réponse aux stress.....	61
4.3 – Réponse aux stress des plantes transformées pour <i>LeEF-Ts_{mt}</i>	63
CHAPITRE III.....	65
EFFETS DE LA SOUS ET SUR EXPRESSION DE <i>LEEF-TS_{MT}</i> SUR LE PROTEOME MITOCHONDRIAL DE CALS DE TOMATES.....	65
1. INTRODUCTION.....	65
2 - MATERIEL ET METHODES.....	66
2.1- Cultures de cals.....	66
2.2 - Marquage isotopique différentiel des protéines.....	66
2.3 - Isolement et purification des mitochondries.....	66
2.4 - Mesure de l'activité Cytochrome C Oxydase (CcO - EC 1.9.3.1).....	68
2.5 - Détermination de la pureté des mitochondries.....	69
2.5.1- Alcool deshydrogenase (ADH - EC 1.1.1.1).....	69
2.5.2 - Alcaline Pyrophosphatase (alkPP - EC 3.6.1.1).....	70
2.5.3 – Catalase :.....	70
2.6 - Électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS/PAGE).....	71
2.7 - Coloration et décoloration des gels.....	71
2.8 - Analyse d'image.....	72
2.9 - Excision et lavage des zones de gel.....	72
2.10 - Digestion trypsique, extraction des peptides et préparation des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse.....	72
2.11 - Analyses par spectrométrie de masse.....	73
2.12 - Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	73
2.13 - Identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem LC/MS/MS.....	74
2.14 - Quantification relative des protéines par spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS après marquage métabolique à l'azote ¹⁵ N.....	74
2.15 – Séquençage du proteome total mitochondrial.....	75
3 - RESULTATS.....	77
3.1 – Purification des mitochondries.....	77
3.2 – Effet de la transgénèse sur les modification des profils protéiques.....	77
3.2 – Effet de la transgénèse sur les modification des profils protéiques.....	78
3.2.1 - Etude des profils de séparation par SDS-PAGE de protéines de mitochondries issues de cals WT, AS et S colorées au bleu de Coomassie R250.....	78
3.2.2 - Etude des profils de séparation par SDS-PAGE de protéines de mitochondries issues de cals WT, AS et S colorées au bleu colloïdal G250.....	78
3.2.3 - Quantification relative des protéines par spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS après marquage métabolique à l'azote ¹⁵ N.....	81
3.3 - Analyse globale du protéome mitochondrial.....	84
3.3.1 - Identification des protéines mitochondriales de la tomate.....	84
3.3.2 - Comparaison avec d'autres orthologues mitochondriaux.....	84
3.3.3 -Prédictions bioinformatiques de l'adressage subcellulaire.....	85
4 – DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	87
DISCUSSION GENERALE.....	88
REFERENCES.....	91

RESUME EN FRANCAIS

Cette thèse est relative à l'étude fonctionnelle d'un gène codant pour un facteur d'élongation *Le-EF-Ts_{mt}* chez la tomate. Ce gène participe au processus de synthèse des protéines dans la mitochondrie et présente une forte expression au cours de la maturation par comparaison avec d'autres organes. Nous démontrons qu'il est fortement exprimé pendant les premiers stades de la maturation en parallèle avec la crise respiratoire climactérique et que son expression est stimulée par l'éthylène, la blessure et de hautes températures. Cependant, les mutants de tomate insensibles à l'éthylène présentent une expression assez élevée indiquant la présence d'une régulation indépendante de l'éthylène. Des fruits transgéniques ont été générés dans lesquels *LeEF-Ts_{mt}* a été sur- et sous-exprimé de façon constitutive. Cependant, l'altération de l'expression du gène par transformation génétique avec des constructions sens et antisens de *LeEF-Ts_{mt}* n'affecte pas la respiration et la production d'éthylène pendant la maturation et après blessure. De plus, l'expression du gène de l'alternative oxydase qui est connue pour jouer un rôle important dans la respiration climactérique n'est pas affectée. Toutes ces données indiquent que malgré sa forte régulation *Le-EF-Ts_{mt}* n'est pas limitant de l'activité respiratoire mitochondriale.

L'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* est stimulée sous l'effet de stress oxydatifs induits dans les parties végétatives par la sécheresse et le paraquat. La sensibilité aux stress oxydatifs évaluée chez les feuilles par la présence de nécrose et dans des cals par la croissance cellulaire est réduite chez les plantes antisens. Parmi les enzymes connues pour intervenir dans la détoxification des espèces réactives d'oxygène, superoxide dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxydases (PX) et glutathion réductases (GR), nous avons montré que la GR et les PX ont une activité accrue chez les lignées antisens permettant d'expliquer, au moins en partie, leur meilleure tolérance aux stress.

Le rôle de la protéine *LeEF-Ts_{mt}* dans la synthèse des protéines mitochondriales a été étudié par une analyse du protéome mitochondrial de lignées antisens et sens pour le gène *LeEF-Ts_{mt}*. La comparaison des protéomes des lignées transformées et sauvage a été abordée à l'aide d'une technique de double marquage ¹⁴N/¹⁵N appliquée à des tissus de tomates cultivés in vitro. Il apparaît que les lignées sens sur-expriment fortement la protéine alors que les lignées antisens la sous-expriment faiblement. Une protéine de type «heat-shock» accompagne les variations de *LeEF-Ts_{mt}* suggérant un rôle possible de chaperonne. Par ailleurs, l'analyse globale du protéome mitochondrial fournit des données générales nouvelles sur un ensemble de près de 500 protéines mitochondriales de tomate.

RESUME EN ANGLAIS

This thesis is related to the functional study of a gene encoding an elongation factor LeEF-Ts_{mt} in tomato. This gene participates in the protein synthesis process in mitochondria and shows strong expression in ripening fruit as compared to other organs. We demonstrate that it is strongly up-regulated during the first stages of the ripening process in parallel with the climacteric rise in respiration and that its expression is stimulated by ethylene, wounding and high temperature. However, ethylene-insensitive mutants exhibit rather high expression indicating the presence of an important ethylene-independent regulation. Transgenic fruit have been generated in which *LeEF-Ts_{mt}* has been constitutively up and down-regulated. However, altering the expression of the gene by genetic transformation with antisense and sense *LeEF-Ts_{mt}* constructs did not affect the pattern of respiration and ethylene production during ripening and upon wounding. In addition, expression of the alternate oxidase gene which is known to play an important role in respiratory climacteric was not affected. All these data indicate that LeEF-Ts_{mt}, despite its strong regulation, is not limiting of the mitochondrial respiratory activity.

The expression of the *LeEF-Ts_{mt}* gene is stimulated by oxidative stresses induced in the vegetative parts of the plant by drought and paraquat. Sensitivity to stresses evaluated in leaves by the presence of necrosis and in calluses by cellular growth was reduced in antisense plants. Among the enzymes known for playing a role in the detoxication of reactive oxygen species, superoxide dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidases (PX) and glutathion reductases (GR), we have shown that GR and PX exhibit higher activity in antisense lines, thus explaining, at least partly, a better tolerance to stress.

The role of the LeEF-Ts_{mt} protein in the synthesis of mitochondrial proteins has been studied through the analysis of the mitochondrial proteome of *LeEF-Ts_{mt}* sense and antisense lines. The comparison of the proteomes of the wild type and transformed lines has been made using dual ¹⁴N/¹⁵N labelling applied to tissues cultured in vitro. It appeared that the sense lines greatly over-express the protein while the antisense lines under-express lightly. An heat-shock protein tightly follows the variations of the LeEF-Ts_{mt} protein suggesting a possible role of chaperon. A global analysis of the mitochondrial proteome has been performed that provides new information on a set of around 500 mitochondrial proteins of tomato.

RESUME EN PORTUGAIS

Esta tese é relacionada ao estudo funcional de um gene que codifica um fator de alongação *LeEF-Ts_{mt}* em tomate. Este gene participa no processo de síntese de proteína em mitocôndrias e apresenta uma forte expressão durante o processo de maturação quando comparado a outros órgãos. Nós demonstramos que o mesmo se exprime fortemente durante as primeiras fases do processo maturação em paralelo com a crise respiratória climatérica e que sua expressão é estimulada pelo etileno, ferimento e altas temperaturas. Porém, os mutantes de tomate insensíveis ao etileno, exibem uma expressão normal. Frutos transgênicos foram gerados, nos quais o *LeEF-Ts_{mt}* foi aumentado ou inibido de uma forma constitutiva. Porém, a alteração da expressão do gene através da transformação genética com construções sentido e antisense do gene *LeEF-Ts_{mt}* não afeta o padrão de respiração e produção de etileno durante a maturação e após o ferimento. Além disso, a expressão do gene da alternativa oxidase, que é conhecida por apresentar um papel importante no climatério respiratório, não foi afetada. Todos estes dados indicam que apesar de sua forte regulação, o *LeEF-Ts_{mt}* não é limitante da atividade respiratória mitocondrial.

A expressão do gene de *LeEF-Ts_{mt}* é estimulada pelo efeito do estresse oxidativo induzido nas partes vegetativas da planta pela seca e o paraquat. A sensibilidade ao estresse oxidativo avaliado em folhas pela presença de necrose e em calos através de crescimento celular, foi reduzido em plantas antisentido. Entre as enzimas conhecidas por apresentar um papel na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidase (PX) e glutathione redutase (GR), nós demonstramos que a GR e PX exibem atividade mais alta em linhas antisentido, explicando assim, pelo menos em parte, sua melhor tolerância ao estresse.

O papel da proteína de *LeEF-Ts_{mt}* na síntese de proteínas mitocondriais foi estudado pela análise do proteoma mitocondrial em linhas antisentido e sentido do gene *LeEF-Ts_{mt}*. A comparação dos proteomas de linhas transformadas e selvagem foi tratado com a ajuda de uma técnica de dupla marcagem ¹⁴N/¹⁵N aplicadas à tecidos de tomate cultivados *in vitro*. A linha sentido super expressa fortemente a proteína, enquanto que as linhas antisentidos diminuem ligeiramente. Uma proteína do tipo “heat-shock” segue as variações da proteína *LeEF-Ts_{mt}*, sugerindo um possível papel chaperona. Uma análise global do proteoma mitocondrial foi executada, fornecendo novas informações sobre um conjunto de ao redor 500 proteínas mitocondriais de tomate.

BREVE PRESENTATION GENERALE ET OBJECTIFS

De nombreuses études ont été consacrées à la détermination de la nature de la crise climactérique respiratoire et à la compréhension du rôle des mitochondries qui sont le siège de la respiration. Une augmentation du flux de carbone via la glycolyse a été démontré pendant la crise respiratoire associée à une importante augmentation d'ATP (Barker and Solomos, 1962). L'accroissement de la glycolyse est supposé lié à l'activation de la phosphofructokinase et de la pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransférase (Bennett et al., 1987). Cependant la démonstration que l'activation de ces deux enzymes est directement responsable de la crise climactérique n'a jamais été apportée. La crise respiratoire a été également attribuée à l'accroissement de l'activité d'un oxydase alternative insensible au cyanure (AOX) et au découplage du transport des électrons de la phosphorylation oxydative de l'ATP (Solomos, 1977). Les gènes codant pour l'AOX (McIntosh, 1994) et une protéine de découplage (Laloi et al., 1997) ont été isolés et l'expression de certains membres de ces familles de gènes augmente au cours de la maturation. Néanmoins, l'implication directe de ces gènes (protéines) dans la crise respiratoire n'a pas encore été démontrée. De plus, il existe une contradiction entre l'accroissement d'ATP et l'augmentation de l'activité des systèmes dits «dissipateurs d'énergie» que sont l'AOX et la protéine de découplage qui, au contraire, sont découplés des phosphorylations oxydatives et libèrent uniquement de la chaleur.

Il est connu que la crise respiratoire est sous la dépendance de l'éthylène (Abeles, 1992). D'ailleurs, la suppression de la synthèse d'éthylène conduit à une suppression de la crise respiratoire chez le melon (Bower et al. 2002). La respiration induite par l'éthylène a été associée à la stimulation de la synthèse de protéines codées par le génome nucléaire et ciblées vers la mitochondrie telles que l'AOX et la protéine de découplage (Cruz-Hernandez and Gomez-Lim, 1995; Considine et al., 2001). Puisque la mitochondrie est une organelle qui ne synthétise (Dirolez et al., 1986) ni ne perçoit (Chen et al., 2002) l'éthylène, la stimulation de la respiration est donc dépendante de l'importation de protéines et non de la stimulation de sa propre machinerie.

Lors d'un criblage destiné à isoler des gènes répondant à l'éthylène dans des fruits de tomate (*Lycopersicon esculentum*) un mRNA a été isolé au laboratoire par "differential display", appelé initialement ER49 puis *LeEF-Ts_{mt}*, qui montre une homologie de séquence avec les facteurs d'élongation de type Ts (EF-Ts) à la fois de procaryotes et de mitochondries d'eucaryotes (Zegzouti et al., 1999). Bénichou et al., (2003) ont montré que la protéine codée par ce gène est impliquée dans l'échange de nucléotides avec le facteur Tu (EF-Tu) en

régénérant le GDP en GTP et est capable de diriger la synthèse de peptides *in vitro*. Le fonctionnement de l'ensemble de la machinerie peut être expliqué de la façon suivante. Le facteur d'élongation factor Tu (EF-Tu) facilite la liaison de l'aminocyl-tRNA (aa-tRNA) au ribosome pendant le cycle de l'élongation de la biosynthèse des protéines (Ravel *et al.*, 1969). Après la liaison du aa-tRNA au site A du ribosome, EF-Tu catalyse l'hydrolyse du GTP, et l'EF-Tu:GDP est libéré du ribosome. EF-Ts catalyse l'échange de nucléotide en réalisant la formation de EF-Tu:GTP à partir de EF-Tu:GDP (Miller and Weissbach, 1970). L'échange du nucléotide de guanine se fait via la formation d'un intermédiaire correspondant au complexe EF-Tu:Ts complex. Ensuite, le GTP remplace EF-Ts dans le complexe et le complexe EF-Tu:GTP lie le aa-tRNA permettant un autre cycle de liaison au ribosome. Un schéma de cette réaction est présenté dans la figure 1.

La découverte du gène *LeEF-Ts_{mt}*, la démonstration de l'activité de la protéine correspondante et le fait que son expression soit stimulée par l'éthylène nous a conduit à rechercher son rôle fonctionnel chez la tomate. C'est pourquoi nous avons entrepris tout d'abord une étude précise de son expression spatio-temporelle dans différents organes de la tomate en attachant une attention particulière au fruit au cours de la maturation et aux effets de l'éthylène exogène et de stress abiotiques. Nous avons recherché les effets de la sur- et de la sous-expression de ce gène sur l'activité respiratoire des fruits (Chapitre I). Nous avons ensuite étudié les effets de stress abiotiques sur la physiologie des parties végétatives de plants de tomates affectés par transgénèse dans l'expression de *LeEF-Ts_{mt}*. Cette étude nous a amené à évaluer l'activité de plusieurs enzymes (Superoxyde dismutase, catalase, gaïacol peroxydase, glutation reductase) sous l'effet de divers stress abiotiques (Chapitre II). Enfin nous avons entrepris une étude des modifications induites au niveau du protéome mitochondrial, ce qui a exigé l'obtention de mitochondries hautement purifiées, l'application de méthodes de protéomique différentielle utilisant le double marquage N14/N15 et l'exploitation des résultats de protéomique par des méthodes de bio-informatique (Chapitre III).

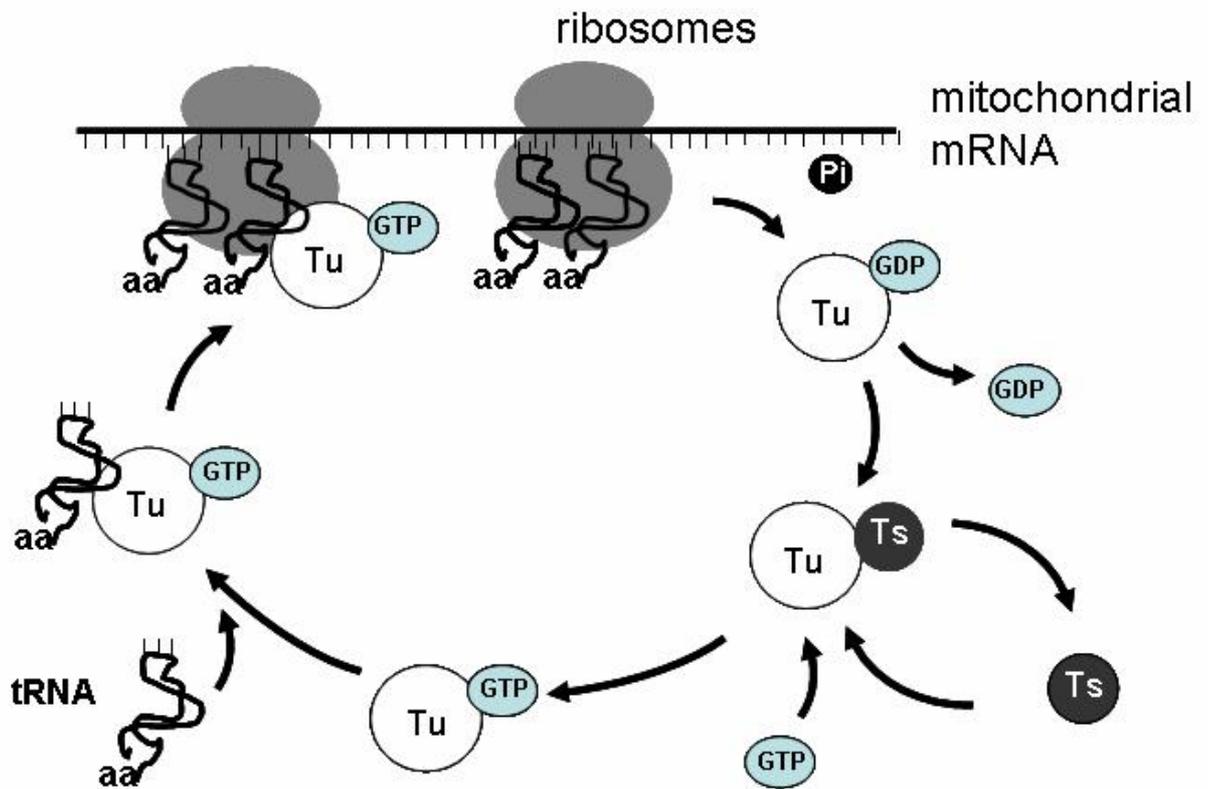


Figure 1: Schematic representation of the function of EF-Ts_{mt} (Ts) protein in promoting the exchange of GDP to GTP for the activation of the EF-Tu_{mt} (Tu) elongation factor.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

La maturation des fruits correspond à un ensemble de modifications biochimiques, physiologiques et structurales qui confèrent au fruit ses qualités organoleptiques et le rendent consommable. Bien que ces processus varient d'un type de fruit à un autre, on classe les fruits en deux catégories, climactériques et non climactériques (Biale, 1964). Le classement dans l'une ou l'autre de ces deux catégories dépend de la présence ou non d'une crise respiratoire et d'un pic de synthèse d'éthylène au moment de la maturation (McMurchie et al., 1972). L'augmentation brutale de synthèse d'éthylène observé chez les fruits climactériques est considérée comme responsable des modifications de couleur, d'arômes, de texture, de saveur et d'autres paramètres biochimiques et physiologiques. A l'inverse, chez les fruits non-climactériques, on considère que les modifications survenant au cours de la maturation ne sont pas dépendantes de l'éthylène et on ignore les facteurs de régulation impliqués.

Au cours des deux dernières décennies, avec l'apparition des méthodes et concepts de la biologie moléculaire, la maturation est apparue comme un phénomène de développement génétiquement programmé et impliquant l'expression de gènes spécifiques (Grierson, 1987). Les mécanismes de maturation des fruits climactériques ont de loin été les plus étudiés en raison du rôle majeur de l'éthylène et des progrès importants réalisés dans la connaissance de la biosynthèse (Sato et Theologis, 1989 ; Van der Straeten et al., 1990 ; Hamilton et al., 1990 ; Spanu et al., 1994) et de l'action de cette hormone (Ecker, 1995, Stepanova et Ecker, 2000).

De nombreuses revues ont été consacrées aux mécanismes de maturation des fruits en termes biochimiques, physiologiques et moléculaires (Giovannoni, 2001 ; Lelièvre et al., 1997; Brady, 1987). Dans ce chapitre, nous résumerons tout d'abord le rôle de l'éthylène et les mécanismes de la respiration. Nous aborderons ensuite de façon plus approfondie l'état des connaissances dans les domaines qui font plus précisément l'objet de nos travaux, c'est-à-dire en premier lieu le fonctionnement des mitochondries et plus particulièrement les mécanismes de traduction des protéines dans les mitochondries. Ensuite, nous ferons une brève description des connaissances sur les stress oxydatifs. Enfin nous donnerons quelques informations sur la protéomique des mitochondries.

1-Biosynthèse et rôle de l'éthylène.

Les étapes de biosynthèse de l'éthylène ont été totalement élucidées, en particulier grâce aux travaux de Yang et Hoffman, (1984). La figure 2 donne le schéma général de la biosynthèse de l'éthylène. Le contrôle de la biosynthèse de l'éthylène se fait grâce à deux enzymes clefs. L'ACC synthase (ACS) qui transforme la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) et l'ACC oxydase (ACO) qui assure l'oxydation de l'ACC en éthylène. Ces deux enzymes sont codées par des familles multigéniques. On considère classiquement qu'il existe deux systèmes de régulation de la biosynthèse de l'éthylène chez les plantes supérieures (Lelièvre *et al.*, 1997). Le système 1 est fonctionnel durant la croissance végétative, contrôlé négativement par l'éthylène, et permet la production d'un niveau basal d'éthylène détectable dans tous les tissus et même dans les fruits jeunes. Par contre le système 2 est fonctionnel durant le mûrissement des fruits climactériques et durant la sénescence des pétales. Ce système est contrôlé positivement par l'éthylène et nécessite l'induction de l'expression de gène *ACS* et *ACO* (synthèse auto-catalytique). Les voies de transduction conduisant à cette induction sont encore inconnues mais il est possible que ce soit dû à une combinaison de facteurs dépendant de l'éthylène et du développement (Picton *et al.*, 1993; Guis *et al.*, 1997). Chez la tomate, le système 1 continue tout au long du développement du fruit jusqu'à ce qu'une phase de transition apparaisse, correspondant au stade où le fruit a acquis la compétence à mûrir. Ensuite, le système 2 se met en place (Barry *et al.*, 1996).

Toujours chez la tomate, une étude sur la régulation des différents membres de la famille multigénique codant pour des ACS a été réalisée au cours du développement et de la maturation du fruit (Barry *et al.*, 2000). Certains de ces gènes (*LeACS6* et *LeACS1A*) associés au système 1, d'autres à la transitions système1/système 2 et à l'acquisition de la compétence à mûrir (*LeACS1A* et *LeACS4*) et d'autres au système 2 exclusivement (*LeACS2*). A l'instar des gènes ACS, les gènes ACO sont codés par une famille multigénique et il existe au moins trois membres chez la tomate dont le profil d'expression est spécifique pour chacun des membres (Barry *et al.*, 1996 ; Bidonde *et al.*, 1998). Les transcrits de *LeACO1* et *LeACO3* s'accumulent au cours de la sénescence des feuilles, dans les fruits et dans les fleurs. L'expression de *LeACO1* est aussi régulée par la blessure sur les feuilles. Par contre, les transcrits de *LeACO2* sont principalement visibles dans les tissus associés à l'anthere (Barry *et al.*, 1996)

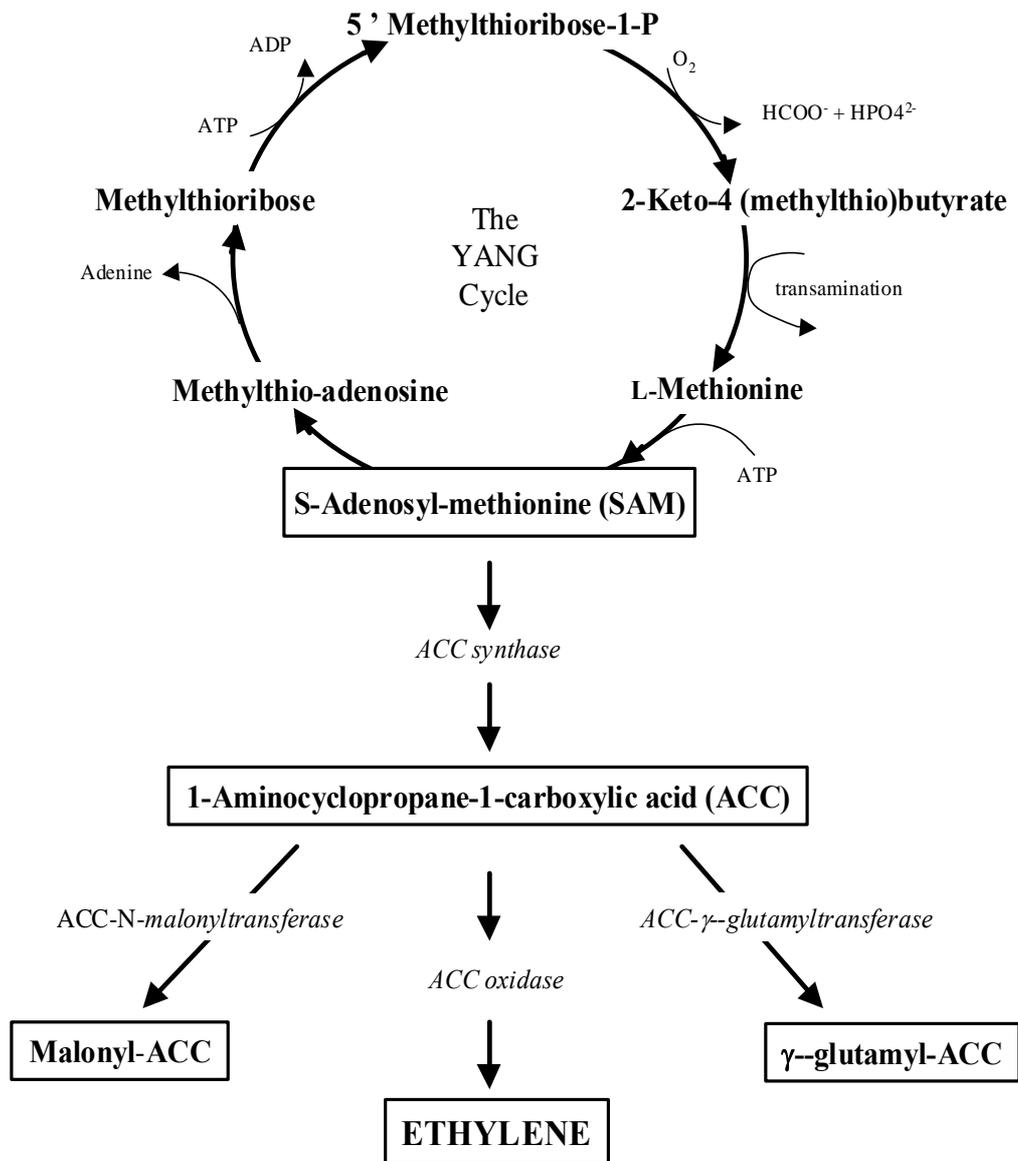


Figure 2: Chaîne de biosynthèse de l'éthylène

1-1- Facteurs externes influant sur la synthèse d'éthylène et sur maturation

Parmi les stimuli externes au fruit, certains ont une conséquence importante sur la maturation du fruit car ils peuvent modifier la biosynthèse de l'éthylène. Les basses températures sont appliquées d'une façon générale pour prolonger la durée de survie des fruits dans la limite de leur sensibilité aux basses températures. Le séjour au froid se traduit, chez la poire *Passe-crassane* par une accumulation importante de transcripts correspondants à l'ACC oxydase et l'ACC synthase (Lelièvre et al., 1997). Chez d'autres types de fruits, tels que le kiwi et la pomme, les basses températures accélèrent la capacité du fruit à produire de l'éthylène et synchronise la maturation (Knee et al., 1983 ; Jobling et al., 1991). Par contre, de nombreux fruits tropicaux ou sub-tropicaux subissent, à la suite d'un séjour plus ou moins prolongé à basse température, des désordres physiologiques appelés la maladie du froid (Marcelin, 1992 ; Wang, 1989). L'oxygène joue un rôle important dans la maturation car il intervient dans la chaîne respiratoire. Par ailleurs, l'oxygène est un substrat de l'ACC oxydase. Des faibles niveaux d'oxygène réduisent l'expression de gènes régulés par l'éthylène et impliqués dans la maturation des fruits (Kanellis et al., 1990). Lors de la conservation en atmosphère modifiée ou contrôlée, les faibles niveaux d'oxygène et les niveaux élevés de gaz carbonique agissent en combinaison pour modifier le métabolisme des fruits et la synthèse ou la sensibilité à l'éthylène (Kader, 1997). D'autres stress tels que les blessures, les attaques par des agents pathogènes ou les métaux lourds provoquent la stimulation de l'ACC synthase (Yang et Hoffmann, 1984). Il est donc primordial d'éviter ces causes de stress pour prolonger la durée de vie du fruit après la récolte. Il existe une relation entre le stress hydrique et la maturation. Chez les fruits climactériques tels que l'avocat ou la banane (Adato et Gazit, 1974), l'augmentation du déficit hydrique après la récolte accélère l'apparition du pic de synthèse d'éthylène.

En conclusion, la biosynthèse de l'éthylène est régulée par le développement de la plante et par de nombreux stress biotiques et abiotiques

1-2 Les mécanismes dépendants de l'éthylène au cours de la maturation des fruits.

La création de lignées transgéniques de tomate (Murray *et al.*, 1993 ; Picton *et al.*, 1993; Theologis *et al.*, 1993) et de melon (Ayub *et al.*, 1996) dont la synthèse d'éthylène a été inhibée à l'aide d'une construction *ACO* ou *ACS* en orientation anti-sens ont permis de

distinguer les phénomènes du mûrissement qui dépendent de l'éthylène et ceux qui ne dépendent pas de l'éthylène. Le changement de couleur peut être dépendant ou indépendant de l'éthylène en fonction du pigment et du type de fruit. Par exemple, l'accumulation du lycopène dans les tomates ne produisant plus d'éthylène est fortement réduite (Oeller *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1993). Par contre, dans le melon, la synthèse de caroténoïdes est un phénomène indépendant de l'éthylène (Guis *et al.*, 1997). La dégradation des chlorophylles est totalement dépendante de l'éthylène, en accord avec l'observation que l'éthylène stimule l'expression d'un gène codant pour une chlorophyllase (Jacob-Wilk *et al.*, 1999). L'accumulation des sucres et des acides n'est pas affectée par l'absence d'éthylène. Le ramollissement et la détérioration des membranes sont partiellement contrôlés par l'éthylène. Par exemple, dans la famille de gènes codant pour une polygalacturonase (enzyme de la dégradation des parois) de melon, certains membres sont régulés par l'éthylène et d'autres non (Guis *et al.*, 1997). La synthèse d'arômes volatiles est dépendante de l'éthylène dans la tomate et le melon (Baldwin *et al.*, 2000) ; (Bauchot *et al.*, 1998), même si certaines voies de biosynthèse des arômes échappent au contrôle de l'éthylène (Flores *et al.*, 2002). Ainsi, le mûrissement des fruits climactériques est un processus complexe dans lequel l'éthylène joue un rôle important en association avec d'autres hormones et des facteurs du développement. Ce processus met en jeu des mécanismes dépendants de l'éthylène mais aussi indépendants de l'éthylène.

2- Mécanismes de la crise respiratoire

L'augmentation de la respiration nommée crise climactérique a été décrite pour la première fois chez la pomme par Kidd and West (1925). Plus tard ce phénomène a été démontré chez de nombreux autres fruits dits « climactériques ». Cependant il n'est pas universel et de très nombreux fruits mûrissent sans crise respiratoire. Ils ont été dénommés « non-climactériques » (Biale and Young, 1981).

La nature de la crise climactérique respiratoire et la compréhension du rôle des mitochondries dans cette crise respiratoire a fait l'objet de nombreuses études. Cependant les mécanismes intimes ne sont pas encore élucidés. Il a été établi que le flux de carbone via la glycolyse augmente pendant la crise respiratoire en même temps que la synthèse d'ATP. (Barker and Solomos, 1962). Ceci serait dû à l'activation de la phosphofructokinase et de la pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransférase (Bennett *et al.*, 1987). Un deuxième mécanisme a été décrit dans lequel la crise respiratoire a été également attribuée à

l'accroissement de l'activité d'une oxydase alternative insensible au cyanure (AOX) et au découplage du transport des électrons de la phosphorylation oxydative de l'ATP (Solomos, 1977). L'AOX oxyde l'ubiquinol et réduit l'oxygène sans production d'ATP mais avec dissipation d'énergie. En plus de cette alternative oxydase, les mitochondries de fruits contiennent un autre système de dissipation d'énergie. Il s'agit d'une protéine de découplage appelée PUMP qui agirait comme un transporteur mitochondrial qui exporterait des acides gras libres sous forme anionique à travers la membrane interne mitochondriale (Sluse et Jarmuskiewski, 2000). Les acides gras protonés entreraient à nouveau dans la matrice interne par diffusion, ce qui correspondrait à une entrée de H⁺, à un détournement de la voie de l'ATP synthase et en conséquence un découplage du transport d'électrons et de la phosphorylation oxydative. Une augmentation de la température a été observée chez des fruits intacts tels que la mangue et la banane lors de la maturation démontrant ainsi le rôle probable de l'AOX et/ou de la PUMP dans la crise respiratoire (Kumar et Sinha, 1992, Sluse et Jarmuskiewski 1998). Les gènes codant pour l'AOX (McIntosh, 1994) et une protéine PUMP (Laloi et al., 1997) ont été isolés et l'expression de certains membres de ces familles de gènes augmente au cours de la maturation. Néanmoins, chez la tomate, il semblerait que la protéine AOX diminue au cours des stades précoces de maturation et la protéine PUMP au delà du stage tournant indiquant l'absence de corrélation directe avec la crise respiratoire (Sluse et Jarmuskiewski, 2000). Autrement dit, l'implication directe de ces gènes (protéines) dans la crise respiratoire n'a pas encore été démontrée. Par ailleurs on ignore pourquoi la teneur en ATP s'accroît au cours de la crise respiratoire alors que l'activité des systèmes dits «dissipateurs d'énergie» que sont l'AOX et la PUMP augmenterait également. Ces systèmes sont au contraire découplés des phosphorylations oxydatives et devraient conduire à une moindre production d'ATP.

3- Fonctionnement et rôle des mitochondries

Une des fonctions les plus importantes et les plus connues de la mitochondrie est la production d'énergie par le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. La glycolyse située dans le cytoplasme permet la production de pyruvate, de NADH et d'ATP à partir de glucose. Une certaine proportion du pyruvate est impliquée dans la fermentation alcoolique et une autre partie est transportée dans la mitochondrie. Son oxydation en acétylcoenzyme A permet au cycle de Krebs de produire du CO₂, 2 molécules d'ATP, 6 molécules de NADH et 2 molécules de FADH₂. Le cycle de Krebs fournit ainsi les différents substrats des complexes

respiratoires et du métabolisme général de la cellule. Ces substrats diffusent passivement ou alors sont transportés activement hors de la mitochondrie pour participer à de nombreux mécanismes cellulaires. Si le cycle de Krebs est un carrefour métabolique dans le fonctionnement cellulaire, la production d'ATP est principalement due à la phosphorylation oxydative au sein de la chaîne respiratoire (Mackenzie and McIntosh, 1999). Elle est composée de cinq complexes protéiques membranaires appelés complexes I, II, III, IV et V situés dans la membrane interne mitochondriale (figure 3). Chez les végétaux, les génomes nucléaire et mitochondrial participent tous les deux au codage des sous-unités des complexes excepté pour le complexe II où seul le génome nucléaire est impliqué. La phosphorylation oxydative est caractérisée par un transfert d'électrons du complexe I au complexe IV, permis par l'oxydation et la réduction de différentes molécules comme l'ubiquinone et le cytochrome c. Ce transfert est accompagné d'une consommation d'oxygène et d'une production d'ATP utilisant le gradient électrochimique de protons généré par les complexes I, III et IV (Anderson *et al.*, 1981).

Contrairement aux mammifères, les plantes et quelques autres espèces possèdent une activité respiratoire qui est partiellement résistante au cyanure. Cette caractéristique a été établie depuis la fin des années 20. Cette originalité est due à la présence d'une enzyme qui a été nommée l'alternative oxydase (AOX) (Huq *et al.* 1978; Rich *et al.* 1978). Cette enzyme a été retrouvée chez toutes les plantes supérieures examinées à ce jour mais aussi chez de nombreuses algues, champignons, levures et protozoaires. Cette enzyme ne participe pas à la formation du gradient électrochimique de protons nécessaire au fonctionnement du complexe V (Molle 2002), contrairement au cytochrome c oxydase par exemple. La chaleur dégagée par cette activité a permis d'expliquer certaines caractéristiques des plantes thermogéniques. Ces plantes exploitent ce dégagement de chaleur pour volatiliser des composés attractifs pour les insectes pollinisateurs (Meeuse 1975). Cependant, le fait que cette protéine soit présente dans tout le règne végétal tend à prouver qu'elle possède un rôle physiologique plus général. Il apparaît, par exemple, que la présence de l'AOX est importante dans des conditions où la voie du cytochrome c est altérée (Wagner *et al.* 1997). Deux hypothèses principales sont émises aujourd'hui pour expliquer le rôle physiologique de l'AOX: 1- l'activité AOX permettrait un recyclage rapide du pool d'ubiquinone quand l'activité respiratoire est élevée permettant ainsi aux activités liées au cycle de Krebs de ne plus être limitantes. 2- l'activité AOX permettrait de protéger la mitochondrie contre des attaques oxydatives (Vanlerberghe *et al.* 1997; Wagner *et al.* 1997). En effet, les plantes subissent des stress environnementaux très sévères liés entre autres à leur immobilité. Une forte activité alternative oxydase dans des conditions où le taux

de ROS augmente permet de limiter l'apport de ROS par le complexe III en réduisant la voie du cytochrome c (Vanlerberghe et al. 1992).

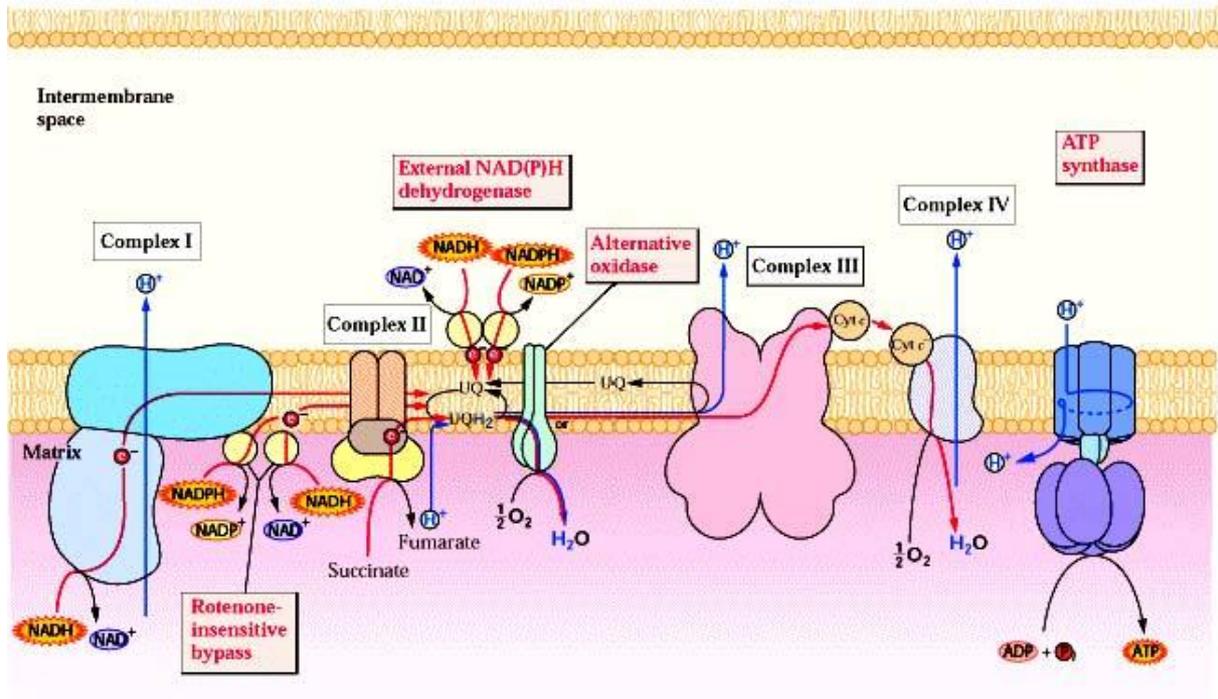


Figure 3 : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne (Buchanan *et al.*, 2000).

4 - Le génome mitochondrial et son expression

Les mitochondries résultent d'un seul événement d'endosymbiose d'une bactérie pourpre photosynthétique appartenant à la classe des α -protéobactéries (Gray and Doolittle, 1982). L'organisme le plus proche des mitochondries est *Rickettsia prowazekii*, un parasite intracellulaire obligatoire (Andersson *et al.*, 1998). Ainsi cette bactérie possède le génome le plus proche des génomes mitochondriaux. La taille des génomes mitochondriaux varie de moins de 6 kb chez *Plasmodium falciparum* à 16 kb pour les génomes mitochondriaux d'animaux (Anderson *et al.*, 1981; Bibb *et al.*, 1981) et jusqu'à plus de 500 kb pour les génomes mitochondriaux de plantes terrestres (Fauron *et al.*, 2004). Le plus grand génome mitochondrial de plante séquencé pour l'instant est celui d'*A. thaliana* dont la taille est de 366 Kb (Unseld *et al.*, 1997). Il est à peu près trois fois plus petit que le génome de *Rickettsia prowazekii*, le plus proche ancêtre des mitochondries (Andersson *et al.*, 1998). Par contre, le génome mitochondrial d'*A. thaliana* ne code que pour un petit nombre de protéines (32) comparé à celui des protéines codées par le génome de *R. prowazekii* (834). Ce faible

pourcentage de protéines codées est dû à la présence d'une forte proportion de séquences non codantes (>80%) (24% pour *R. prowazekii*) (Gray *et al.*, 1999). Les gènes présents sur le génome mitochondrial d'*A. thaliana* peuvent être classés en deux groupes, ceux codant pour des éléments du métabolisme mitochondrial (des composants des complexes respiratoires et des protéines impliquées dans la biogenèse des cytochromes de type *c*) et ceux impliqués dans la machinerie traductionnelle (protéines ribosomales, ARNr, ARNt).

Les fonctions mitochondriales actuelles sont donc le fruit d'une co-évolution entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire, les rendant dépendants l'un de l'autre. Cette évolution s'est traduite notamment par un transfert très important d'information génétique de le noyau vers la mitochondrie. En effet, environ 98% des gènes codant des protéines mitochondriales sont des gènes nucléaires. Chez *Arabidopsis thaliana*, par exemple, cela a conduit à un génome mitochondrial ne comportant plus que 32 gènes (Unsold *et al.* 1997). Les mammifères et les eucaryotes inférieurs possèdent pour la plupart des génomes mitochondriaux compactés alors que ceux des plantes sont les plus expansés (Gray *et al.* 1999). Cette différence des tailles entre eucaryotes est due à la proportion extraordinairement élevée (80%) de séquences non codantes dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis* comparé au génome de *Rickettsia* (24%) (Andersson *et al.* 1998).

La caractéristique principale de l'expression des gènes mitochondriaux végétaux est l'existence, la plupart du temps, d'un nombre élevé d'ARN messagers observés pour un gène donné, associée à une complexité variable des mécanismes d'expression (pour une revue voir Gray 1992; Binder *et al.* 2003). En effet, il existe plusieurs sites d'initiation et de terminaison de transcription ainsi que des phénomènes de clivages post-transcriptionnels et d'épissages importants. La régulation des gènes mitochondriaux s'effectue essentiellement par le produit de gènes nucléaires (Binder *et al.* 2003). C'est le cas, par exemple, de certains gènes de restauration de la fertilité qui influencent l'accumulation de transcrits de gènes mitochondriaux responsables de stérilités mâles cytoplasmiques (Dill *et al.* 1997). Le transfert des gènes de la mitochondrie vers le noyau chez les plantes est facilité par le fait qu'il n'y a pas de barrière de code génétique : les machineries de traduction protéique mitochondriale et cytoplasmique utilisent le même code génétique. Chez les animaux, les mitochondries utilisent un code génétique modifié. Ainsi le contenu génique mitochondrial ne peut plus s'échapper (Berg and Kurland, 2000; Gray, 2000). Il est essentiel que le transfert des gènes mitochondriaux de plantes ait lieu après transcription inverse de l'ARNm épissé et édité (Nugent and Palmer, 1991; Brennicke *et al.*, 1993). Dans le noyau, des recombinaisons permettent l'acquisition des promoteurs et des pré-séquences d'adressage (Henze and Martin,

2001). Ces deux étapes permettent qu'un messenger fonctionnel soit produit et que la protéine traduite soit importée dans les mitochondries. Un exemple de transfert récent d'un gène mitochondrial vers le noyau par l'intermédiaire d'un intermédiaire ARN est celui de *cox2* (sous unité 2 du complexe IV) chez les légumineuses (Nugent and Palmer, 1991; Covello and Gray, 1992).

5- L'importation des protéines dans les mitochondries

La mitochondrie est un organe comprenant plusieurs centaines de protéines différentes et plus de 98% des ces protéines sont codées par des gènes nucléaires. Ces protéines sont traduites dans le cytosol puis transportées jusqu'à la mitochondrie. Le génome mitochondrial d'*A. thaliana* ne code que pour 32 protéines (Unsold *et al.*, 1997) et seules 16 de ces protéines (parmi les plus hydrophobes) sont produites dans la mitochondrie chez *A. thaliana* (Unsold *et al.*, 1997). Les autres doivent être importées du cytoplasme. L'immense majorité des protéines mitochondriales est codée par le génome nucléaire, synthétisée dans le cytoplasme puis importée dans les mitochondries. Ces protéines possèdent un signal d'adressage qui leur permet d'être importées dans les mitochondries. Deux types de signaux d'adressage mitochondrial sont généralement décrits : les pré-séquences et les signaux internes. La pré-séquence consiste en une extension N-terminale de la protéine à importer. Les pré-séquences ne contiennent pas de séquence consensus d'adressage mitochondrial mais elles possèdent quelques particularités. Au niveau de leur structure primaire, elles sont riches en acides aminés basiques, hydrophobes et hydroxylés et elles ont une taille de 10 à 80 acides aminés. Au niveau de leur structure secondaire, elles se replient en une hélice α amphiphile possédant un côté chargé positivement et un côté hydrophobe (von Heijne *et al.*, 1989).

Le système a été largement décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez *Neurospora crassa* (Revue par Neupert 1997). Néanmoins, les mécanismes et les spécificités liés au phénomène d'importation sont suffisamment partagés par tous les eucaryotes, pour que des protéines de levures puissent être importées par des mitochondries végétales et également que des pré-séquences végétales permettent un adressage mitochondrial chez la levure (Huang *et al.* 1995).

6- Rôle de LeEF-Ts_{mt} et mécanismes de synthèse des protéines chez les mitochondries

Les mitochondries possèdent leur propre système de synthèse des protéines. Les eucaryotes ont des systèmes de traduction à la fois dans la mitochondrie et dans le cytoplasme. Les plantes possèdent un troisième système dans le chloroplaste. La fonction de la protéine LeEF-Ts_{mt}, que nous étudions dans cette thèse a été présentée de façon schématique plus haut. Nous nous attacherons ici à décrire les similitudes et les différences entre les différents modèles eucaryotes et procaryotes. La liaison GTP-dépendante d'un aa-tRNA au ribosome et la libération du facteur d'élongation en tant que complexe avec le GDP sont conservés parmi les procaryotes, eucaryotes et organelles d'eucaryotes. En général, les facteurs d'élongation mitochondriaux et chloroplastiques sont plus proches de leur équivalent bactérien que les facteurs d'élongation cytoplasmiques. L'EF-Tu (EF-Tu_{mt}) mitochondrial de mammifères possède une identité de séquence significative (~60%) avec le facteur procaryotique correspondant. Par contre la séquence de EF-Ts est moins conservée que celle du EF-Tu, et des schémas différents sont observés pour les interactions entre EF-Tu et EF-Ts dans différents systèmes (Blank *et al.*, 1995). L'EF-Tu_{mt} de bovin se lie à des nucléotides de guanine moins fortement que les facteurs bactériens (Cai *et al.*, 2000a). L'activité de l'EF-Tu de *E. coli* peut être stimulée à la fois par l'EF-Ts de *E. coli* and EF-Ts_{mt}. Par contre, l'activité de EF-Tu_{mt} n'est pas stimulée par l'EF-Ts de *E. coli* (Bullard *et al.*, 1999). EF-Tu_{mt} forme des complexes ternaires avec les aa-tRNA de mitochondries ou de bactéries et les cible ensuite au site A du ribosome. Cependant, bien que l'EF-Tu de *E. coli* puisse former un complexe ternaire avec les aa-tRNAs de mitochondries, il a une faible capacité à promouvoir la liaison de ces complexes au site A des ribosomes de *E. coli* ou de ribosomes mitochondriaux de mammifères (Kumazawa *et al.*, 1991). Les séquences de EF-Tu et EF-Ts de nombreux procaryotes sont connues (Sprinzl, 1994) mais chez les plantes les facteurs d'élongation mitochondriaux n'avaient pas été caractérisés avant le travail de Bénichou *et al.* (2003). Seules des séquences partielles d'Arabidopsis et d'orge étaient disponibles. En général, les séquences de plantes n'ont pas été identifiées clairement comme des EF-Ts et n'ont pas été affectées au chloroplaste ou à la mitochondrie. Bénichou *et al.* (2003) ont clairement identifié ER-49 comme un EF-Ts_{mt} de tomate (*L. esculentum* ; LeEF-Ts_{mt}) non seulement sur la base d'homologies de séquence avec des EF-Ts de bactéries et d'animaux, mais également par sa capacité à stimuler la synthèse de peptides avec un EF-Tu de *E. coli* et à promouvoir

l'échange de nucléotides de guanine avec ce facteur bactérien. Enfin il est clairement démontré que LeEF-T_{smt} est localisé dans la mitochondrie et non dans le chloroplaste.

7- Les stress oxydatifs et le rôle de la mitochondrie

L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Cependant, dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'hydroxyle radicalaire (OH^\cdot). Ces radicaux centrés sur l'oxygène (appelés ainsi parce que l'électron célibataire est porté par l'atome d'oxygène) sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS Reactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne). Il a été démontré que les ROS oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN. Alors, le stress oxydatif résulte du déséquilibre entre la production d'espèces réactif d'oxygène (ROS) et du système de détoxification, commun dans situations de stress l'environnement y compris attaque de pathogène (Maxwell et al, 1999). Les ROS sont considérées comme des sous produits du métabolisme cellulaire. Elles sont impliquées dans la transduction de signaux de nombreuses voies cellulaires chez les plantes (pour une revue voir Laloi et al. 2004). Dans les tissus végétaux, diverses conditions physiologiques peuvent conduire à des variations très importantes et très soudaines de la quantité de ROS intracellulaire. Le rôle central des ROS dans le végétal a surtout été montré lors de la réponse hypersensible (HR) à une attaque de pathogène (Heath 2000). Dans ce cas, le stress oxydant est rapide, transitoire et localisé au site d'infection. La mort des cellules touchées empêche la diffusion de l'infection aux cellules voisines et constitue un mécanisme de résistance. La réponse de la cellule au stress oxydant est modulée en fonction de la concentration en ROS. Une forte dose de ROS induit la mort cellulaire, une faible dose permet la mise en place d'enzymes antioxydantes et l'arrêt du cycle cellulaire (Vranova et al. 2002). Le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire a été bien établi, mais les mécanismes par lesquels ces signaux sont perçus par la cellule restent inconnus. Une étude a montré que le peroxyde d'hydrogène était un activateur potentiel de cascades MAPK (mitogen activated protein kinase) (Grant et al. 2000). Ces cascades de kinases induisent l'expression de certains gènes lors d'un stress et répriment les gènes

habituellement induits par l'auxine. Ce phénomène d'activation d'une voie de signalisation MAPK dépendante a également été décrit à la suite d'une attaque de pathogène chez *A. thaliana* ou lors du processus d'auto-incompatibilité chez le pavot (Rudd et al. 2003).

La production de ROS est une conséquence inévitable de respiration aérobie. Au cours de la respiration, un ensemble de complexes multi-protéiques intégrés dans la membrane interne mitochondriale et de transporteurs d'électrons tels que l'ubiquinone et le cytochrome C catalysent le transfert d'électrons provenant des intermédiaires réduits du catabolisme (NADH/FADH₂) vers un accepteur final, l'oxygène moléculaire. Cependant, pour une quantité non négligeable d'oxygène (5 à 10%, voire plus dans certaines conditions physiopathologiques), des réactions de transfert mono électronique pourront être favorisées. Bien qu'acceptant toujours au total quatre électrons pour former H₂O, l'oxygène sera réduit par étapes monovalentes, produisant ainsi trois types d'intermédiaires réactifs, le radical superoxyde, O₂⁻, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le radical hydroxyle OH⁻. Ces espèces vont alors soit indirectement favoriser, soit directement initier des réactions en chaîne dont la première étape est souvent la rupture homolytique des liaisons carbone-hydrogène ou l'addition sur les doubles liaisons carbone-carbone des biomolécules constituant le "squelette" de la cellule (phospholipides, protéines, acides nucléiques) (Møller, 2001).

Une des premières études ayant mise en évidence la production de H₂O₂ par des mitochondries intactes a été réalisée par Boveris *et al* en 1972. C'est le fonctionnement même de la chaîne respiratoire qui produit des ROS en conditions physiologiques. Rapidement, il a été montré que cette production d'H₂O₂ est directement liée à la dismutation de l'anion superoxyde. Selon certains auteurs, le pourcentage d'O₂ qui entre dans la chaîne respiratoire pour donner des ROS est de 1 à 4 %. Il est vraisemblable que la production de ROS mitochondriale *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,2 à 0,4%) (Gonzalez-Flecha, 1995). Le débit de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Ainsi, l'inhibition de la chaîne respiratoire augmente l'état de réduction des transporteurs d'électrons du côté du substrat, alors que le reste de la chaîne respiratoire (coté oxygène) est très oxydé (Dai et al., 1998).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Meister, 1983). Les antioxydants cellulaires sont non-enzymatiques et enzymatiques (Maxwell et al, 1999). Les principales enzymes antioxydantes sont les peroxydases, superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase

et la catalase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Møller, 2001).

8- Protéomique de la mitochondrie

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de *LeEF-Ts_{mt}* nous avons entrepris dans cette thèse l'analyse du protéome mitochondrial. Il était donc important de connaître l'avancement des connaissances dans ce domaine.

Les protéines présentes dans la mitochondrie dépendent de deux systèmes génétiques, la mitochondrie elle-même et le noyau. Cependant, la très grande majorité des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires et sont importées dans la mitochondrie. Un grand nombre de ces protéines possèdent un peptide signal dans la partie N-terminale et on peut prédire leur ciblage vers la mitochondrie par des outils bio-informatiques. On a pu ainsi déterminer que plusieurs centaines de protéines étaient dans ce cas. Cependant il est possible que de nombreuses protéines soient transportées par des mécanismes différents, de sorte qu'on ne peut pas évaluer de façon précise par des méthodes prédictives le nombre de protéines mitochondriales. Les prédictions faites dans ce domaine donnent des chiffres allant de 500 à 1000 jusqu'à 3000 ou plus chez *Arabidopsis* (Millar et al., 2004). L'analyse du génome mitochondrial prédit un nombre de gènes de moins de 60 répartis sur l'ensemble des chromosomes d'*Arabidopsis* (Elo et al., 2003). Avec le séquençage de nombreuses EST et de l'ensemble du génome chez les plantes telles que l'*Arabidopsis* et le riz, une masse importante de données est disponible qui permet de prédire quelles sont les protéines codées par le noyau qui ont une localisation dans la mitochondrie. En utilisant des outils de la bio-informatique et sur la base de la séquence signal présente dans la protéine (Claros et Vincens, 1996, Shneider et Fechner, 2004), plusieurs centaines de protéines codées par le génome nucléaire d'*Arabidopsis* ont été prédites comme étant ciblées vers la mitochondrie (Heazelwood et al., 2004). A l'intérieur de ce génome, les gènes codant pour des protéines du métabolisme de l'ARN et de l'ADN sont sur le même cluster (Elo et al., 2003). Par ailleurs le séquençage du génome mitochondrial d'*Arabidopsis* a donné accès à 57 gènes (Unsold et al., 1997). Cependant au delà des ces méthodes prédictives basées sur les séquences nucléotidiques, l'analyse directe du protéome mitochondrial a été entreprise en utilisant les méthodes de protéomique qui combinent l'isolement de mitochondries à un haut degré de pureté, la séparation des protéines sur gel ou par chromatographie et l'identification par

spectrométrie de masse. Des études très poussées ont été réalisées sur le protéome mitochondrial du cœur humain, de la souris et de la levure (Millar et al., 2005). Chez les plantes l'analyse à grande échelle de protéomes d'*Arabidopsis* et de riz est en cours (ref 2 et 6 de Millar). L'analyse du protéome mitochondrial de riz a été entreprise (Heazlewood et al., 2003). Un ensemble de 136 protéines a été identifié en recherchant les séquences codantes issues du séquençage du génome et de séquences d'ESTs. La très grande majorité a une fonction correspondant aux principales activités métaboliques de la mitochondrie. Cependant 23 d'entr'elles n'ont pas pu être affectées d'une fonction. Chez *Arabidopsis*, un nombre beaucoup plus important de 416 protéines a été identifié (Heazlewood et al., 2004). En dehors des protéines impliquées dans les complexes de la chaîne respiratoire, des supercomplexes mitochondriaux et des protéines du métabolisme et des stress oxydatifs, cet ensemble comprend un nombre assez important de protéines peu abondantes impliquées dans la synthèse de DNA, dans la régulation de la transcription, dans l'assemblage des complexes protéiques et dans la signalisation cellulaire. Près de 20% des protéines n'ont pas de fonction connue suggérant qu'il reste encore des fonctions de la mitochondrie à découvrir. Il est intéressant de noter que parmi cet ensemble de protéines seulement la moitié pouvait être prévue comme ciblées vers la mitochondrie par des programmes de prédiction, montrant ainsi les limites de ces programmes. Une comparaison avec le protéome d'autres organismes montre que les protéines impliquées dans les fonctions métaboliques de la mitochondrie d'*Arabidopsis* ont leurs orthologues chez d'autres espèces. Par contre il semblerait qu'une grande diversité existe dans un grand nombre de fonctions de signalisation et de régulation. Ces différences peuvent également être dues au type de tissu dont sont issues les mitochondries et le stade de développement. A notre connaissance aucun travail de protéomique de la mitochondrie n'a été publié chez la tomate. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris d'isoler et de séquencer les protéines de mitochondries de cultures de cellules de tomate afin d'étudier le rôle du gène *LeEF-Ts_{mt}* sur la synthèse de protéines mitochondriales.

A la fin de cette étude bibliographique nous rappellerons le contenu de cette thèse qui est divisée en trois chapitres:

- **Chapitre I**: Etude spatio-temporelle de *LeEF-Ts_{mt}* dans différents organes de la tomate, plus particulièrement dans le fruit au cours de la maturation et sous l'effet de l'éthylène exogène et de stress abiotiques. Conséquences de la sur- et sous-expression de ce gène sur l'activité respiratoire des fruits.

- **Chapitre II**: Effets de stress abiotiques sur le métabolisme oxydatif des parties végétatives de plants de tomates affectés par transgénèse dans l'expression de *LeEF-Ts_{mt}*.

- **Chapitre III**: Etude des modifications induites au niveau du protéome mitochondrial.

CHAPITRE I

The mitochondrial elongation factor LeEF-Ts_{mt} is regulated during tomato fruit ripening and upon wounding and ethylene treatment

Cesar Luis Girardi, Kalina Bermudez¹, Anne Bernadac, Ana Chavez², Mohamed Zouine, Fabiola Jaimes Miranda, Mondher Bouzayen, Jean-Claude Pech, Alain Latché*

UMR 990 INP/ENSAT-INRA, Av. de l'Agrobiopole, BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

*Corresponding author. A. Latché Tel.: +33 562 19 35 60; Fax +33 562 19 35 73; E-mail: latche@ensat.fr

Abstract

A gene encoding an elongation factor LeEF-Ts_{mt} that participates in the protein synthesis process in mitochondria shows strong expression in ripening fruit as compared to other organs. It is strongly up-regulated during the first stages of the ripening process in parallel with the climacteric rise in respiration. *LeEF-Ts_{mt}* expression is stimulated by ethylene, wounding and high temperature but ethylene-insensitive mutants exhibit normal expression. Transgenic fruit have been generated in which *LeEF-Ts_{mt}* has been constitutively up and down-regulated. Surprisingly, altering the expression of the gene by genetic transformation with antisense and sense *LeEF-Ts_{mt}* constructs did not affect the pattern of respiration and ethylene production during ripening and upon wounding. In addition, expression of the alternative oxidase gene which is known to play an important role in respiratory climacteric was not affected. Possible reasons for the absence of effect on respiration of variations of LeEF-Ts_{mt} gene expression are discussed.

Keywords: Mitochondrial elongation factor; *Lycopersicon esculentum*; ethylene; respiration; transgenic plants; wounding

1. Introduction

In climacteric fruit, including tomato, ripening is closely associated with an increase in respiration and the plant hormone ethylene stimulates both processes (Abeles, 1992). The ethylene-induced respiration has been related to the stimulation of the synthesis of nuclear-encoded proteins that are targeted to the mitochondria such as an alternative oxidase and uncoupling protein (Cruz-Hernandez and Gomez-Lim, 1995; Considine et al., 2001). Data of the screening of genes expressed during tomato ripening using cDNA micro-arrays (Alba et al., 2005) show that four genes putatively encoding mitochondrial proteins are up-regulated by ethylene: the 7 kDa subunit of a translocase of outer membrane (accession number: SGN-U147420), an NAD aldehyde dehydrogenase (SGN-U149764), a protoporphyrinogen IX oxidase isozyme (SGN-U147910) and a serine hydroxymethyltransferase (SGN-U148661). Since mitochondria are neither a site for ethylene synthesis (Diolez et al., 1986) nor for ethylene perception (Chen et al., 2002), stimulation of respiration appeared to be related to imported proteins only and not to the stimulation of its endogenous machinery. However, Zegzouti et al. (1999) showed that treating mature green tomato fruit by ethylene resulted in a transient enhanced accumulation of a transcript named ER49 encoded by a nuclear gene later denominated *LeEF-Ts_{mt}* and corresponding to a mitochondrial elongation factor involved in protein synthesis in the mitochondria (Benichou et al., 2003). EF-Ts are nucleotide exchange factors that promote the exchange of GDP for GTP with elongation factors of the EF-Tu type (Merrick, 1992). The elongation steps of mitochondrial translation are well documented in mammals and prokaryotes but not in plants. We have recently carried out a study aimed at assessing the function of the *LeEF-Ts_{mt}* protein. It was demonstrated that the protein was targeted to the mitochondria rather than to the chloroplasts. Biochemical studies with an *E coli* recombinant protein further demonstrated that *LeEF-Ts_{mt}* was capable of stimulating the poly(U)-directed polymerisation of phenylalanine and to catalyse the nucleotide exchange reaction with EF-Tu (Benichou et al., 2003).

In order to further investigate the role of *LeEF-Ts_{mt}*, we have studied the spatio-temporal expression of the gene in different organs of tomato plants with special attention to the ripening fruit and to the effect of ethylene and abiotic stress conditions. Tomato plants in which the *LeEF-Ts_{mt}* gene has been over-expressed and down-regulated have been generated. Biochemical and physiological studies have shown that the level of *LeEF-Ts_{mt}* RNA has no influence on fruit respiratory activity.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Micro-Tom and Ailsa Craig) plants were grown in pots in a culture chamber. The conditions were as follows: 14-h-day/10-h-night cycle, 25/20°C day/night temperature, 70% humidity, 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light intensity. Seeds were surface-sterilised in 50% bleach solution for 10 min, thoroughly rinsed with sterile distilled water, and were then sown in pots filled with a peat substrate (Klasmann-Deilmann, R.H.P. 15).

2.2. Ethylene and MCP treatment, wounding and temperature shocks

Ethylene treatments were performed for 15 min and 5 h in 25 L sealed glass boxes. Tomato fruits at the “mature green” (MG) stage were treated with 50 $\mu\text{l.l}^{-1}$ ethylene and control fruits were exposed to air alone. For wounding treatment, fruits were wounded by inserting 30 times a 0.6 x 23 mm needle through the fruit pericarp. The ethylene inhibitor 1-MCP was applied to detached MG fruit in 3-l jars at 1 $\mu\text{l l}^{-1}$ during 16 h at room temperature. For the temperature treatments, three set of fruit at the “breaker” (Br) stage were placed in a dark chamber at 4°C for 6 days, at 30°C for 2 h and at 4°C for 6 days followed by 2 h at 30°C. After treatments, tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

2.3. Phylogenetic tree

Phylogenetic analysis of EF-Ts sequences was performed using the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) of PHYLIP (Felsenstein, 1992). Bootstrapping was performed by re-sampling from the data 100 times. The tree was drawn by TreeView (Page, 1996). The sequences of the *EF-Ts* genes used in this study were obtained from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and SGN (<http://sgn.cornell.edu>) databases. The predicted amino acid sequences were aligned using CLUSTAL X (Jeanmougin et al., 1998) based on the GONNET protein weight matrix.

2.4. RNA isolation, RT-PCR and real-time PCR

Total RNA was extracted as described in Jones et al. (2002). RT-PCR was performed as described previously (Zegzouti et al., 1999). Forward (F) and reverse (R) primers used for

RT-PCR amplification of the target genes in each RNA sample are the following: for *LeAOX* (F 5'-AGCTGAAAACGAGAGGATGC-3' and R 5'-AAGTGGTGCTGGTGAGTCC-3'), and for *LeUbi3* (F 5'-AGAAGAAGACCTACACCAAGCC-3' and R 5'-TCCCAAGGGTTGTACATACATC-3').

For real-time PCR, DNase-treated RNA (2 µg) was reverse transcribed in a total volume of 20 µL using Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and then PCR was performed using 2 ng of total RNA in a 10 µL reaction volume using SYBR GREEN PCR Master Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an ABI PRISM 7900HT sequence-detection system. PRIMER EXPRESS software (PE-Applied Biosystems) was used to design gene-specific primers: for *LeEF-Ts_{mt}* (F 5'-CAGCCGAGATTTCTCTTCTGA-3', R 5'-TGCTAGTGACAAGAGCAGCTTTG-3' and 3'UTR F 5'-TGTCAGGATCGTGAGAGAACTACCT-3' et R 5' CACGTTCAGAAGTGCCACCA for AS RNA) and for *LeActin* (F 5'-TGTCCTATTACGAGGGTTATGC-3' and R 5'-CAGTTAAATCACGACCAGCAAGAT-3'). Optimal primer concentration was 50 nM. RT-PCR conditions were as follow: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min and one cycle 95°C for 15s and 60° for 15s. Samples were run in triplicate on a 384-well plate. For each sample, a Ct (threshold cycle) value was calculated from the amplification curves by selecting the optimal ΔR_n (emission of reporter dye over starting background fluorescence) in the exponential portion of the amplification plot. Relative fold differences were calculated based on the comparative Ct method using the β -actin as an internal standard.

2.5. CO₂ and ethylene production measurements

Individual fruit of the Micro-Tom variety were placed in sealed 120 ml-flasks for 1h (entire fruit) or 20 min (wounded fruit) at 25°C. Gas samples (1 ml) were withdrawn from the headspace for evaluation of CO₂ by infra-red gas analyzer (LI-COR model LI 820, Lincoln, Nebraska) and ethylene by gas chromatography (Intersmat IGC 120 FB). Following measurements, flasks containing the fruit were fully ventilated. Results were expressed as mmol CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ and µmol ethylene kg⁻¹ h⁻¹.

2.6. Generation of sense and antisense *LeEF-Ts_{mt}* plants

The coding region of the *LeEF-Ts_{mt}* gene was obtained by PCR using Vent polymerase (New England Biolabs) and the following primers : forward 5'-

CCTCCTGATTAGCATCACAGATC-3' and reverse 5'-ATCAAGCAGCATTAGCCAAAGG-3'. This fragment was then cloned into pGA643 binary vector either in antisense and sense orientation under the transcriptional control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the *Nos* terminator. Transgenic plants were generated by *Agrobacterium*-mediated transformation according to Jones et al. (2002) and transformed lines were first selected on kanamycin (70 mg l⁻¹) and then analyzed by PCR to check the presence of the T-DNA insertions. Homozygous plants of the R2 and further generations were used for subsequent physiological experiments.

3. Results

3.1. Tomato *LeEF-Ts_{mt}* is encoded by a single copy gene

Lycopersicon esculentum unigenes BLASTn similarity search (<http://sgn.cornell.edu>) of the mitochondrial *LeEF-Ts_{mt}* nucleotidic sequence gave no other similar sequence than *LeEF-Ts_{mt}* itself. In addition, tBLASTn showed that the chloroplastic *EF-Ts_{cp}* was also an unigene. *Arabidopsis thaliana* genome analysis and database search also identified *AtEF-Ts_{mt}* and *AtEF-Ts_{cp}* as single-copy genes. These results show that nucleotidic sequences of mitochondrial and chloroplastic EF-Ts are highly divergent and strongly suggest that like *Arabidopsis thaliana*, the corresponding genes of tomato are unique. Moreover, phylogenetic relationship of EF-Ts predicted amino acid sequences from prokaryotic and eukaryotic organelles indicates that mitochondrial EF-Ts are more related to bacterial genomes (Fig.I 1) and are highly divergent from their chloroplastic homologs.

3.2 *LeEF-Ts_{mt}* gene is expressed at higher levels in fruit and is regulated during fruit ripening

RNA extracted from stem, leaf, flower, root and fruit tissues of the Ailsa Craig variety were used to assess the accumulation of tomato *LeEF-Ts_{mt}* transcripts by real-time PCR. Figure I. 2 shows that transcript were present in all tissues tested. Accumulation in flowers and roots was about 12 and 8 times higher respectively than in stems. However the most striking observation is that accumulation in ripening fruit was about 80 times higher than in stems. This prompted us to study with more details the pattern of *LeEF-Ts_{mt}* gene expression at different stages of ripening and in non ripening tomato mutants. Figure I. 3 shows that *LeEF-Ts_{mt}* gene undergoes a ripening-associated regulation with increasing expression from mature-green to turning and decreasing thereafter. Ripening impaired mutants *rin*, *nor* and *Nr*

taken at stages equivalent to red, show substantial expression. The comparison of data of figures I. 2 and 3 shows that the level of *LeEF-Ts_{mt}* transcripts in the *rin* and *Nr* fruit is similar to leaves and roots, while expression in *nor* is higher and similar to breaker fruit. Since these mutants are affected for ethylene response, it can be concluded that the regulation of *LeEF-Ts_{mt}* gene (at least for *rin* and *Nr*) has a major developmental component independent of ethylene action corresponding to expression in vegetative tissues.

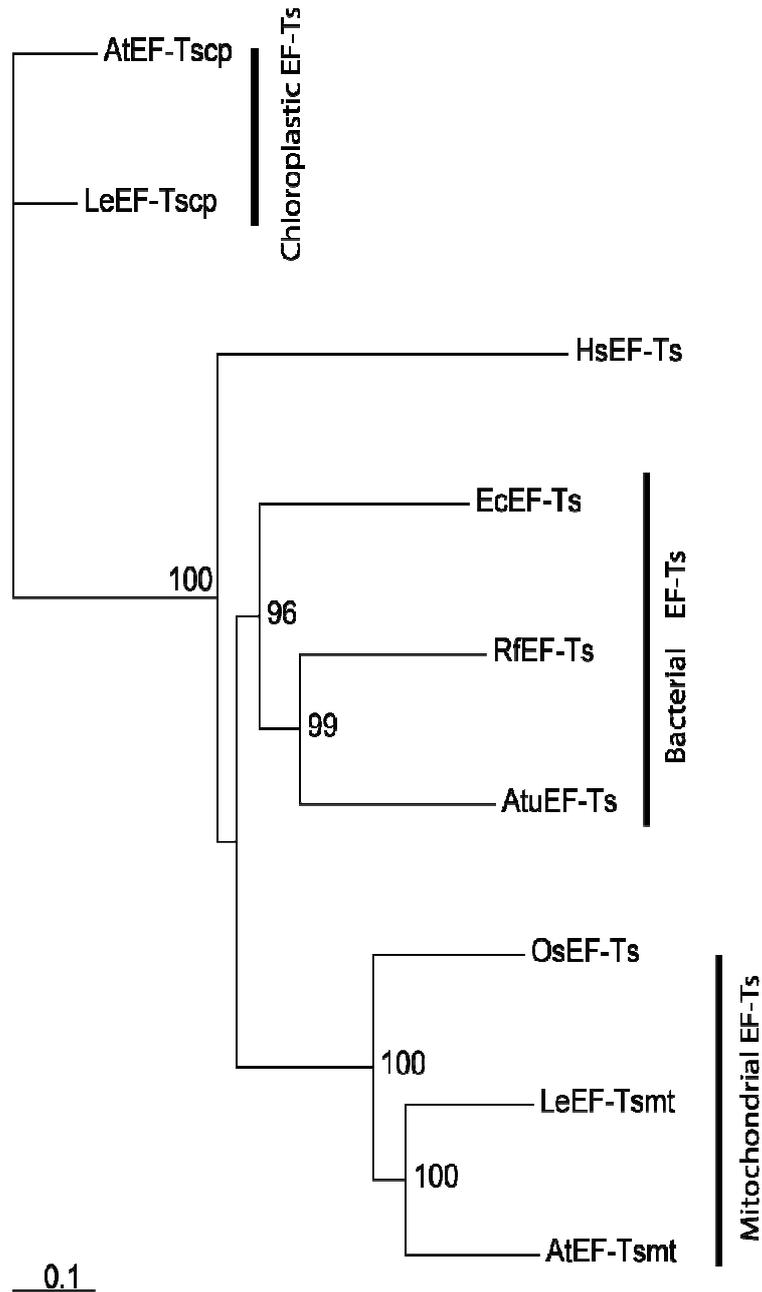


Figure I.1: Consensus neighbour-joining tree based on EF-Ts sequences (bootstrapped 100 times) showing the relationship between various prokaryotic and eukaryotic organelles homologs. Accession numbers of sequences and corresponding databases are: *Lycopersicon esculentum* *LeEF-Ts_{mt}* (GenBank, AF096247.1) and *LeEF-Ts_{cp}* (SGN, SGN-U218510); *Arabidopsis thaliana* *AtEF-Ts_{mt}* (GenBank, NP_192850) and chloroplastic *AtEF-Ts_{cp}* (GenBank, NP_567820); *Oryza sativa* mitochondrial *OsEF-Ts* (GenBank, XP_482256.1); *Rickettsia felis* *RfEF-Ts* (GenBank, AAY60921.1); *Agrobacterium tumefaciens* *AtuEF-Ts* (GenBank, AAK87167.1); *Escherichia coli* *EcEF-Ts* (GenBank, BAB96746.1) and *Homo sapiens* mitochondrial *HsEF-Ts* (GenBank, NP_005717.2).

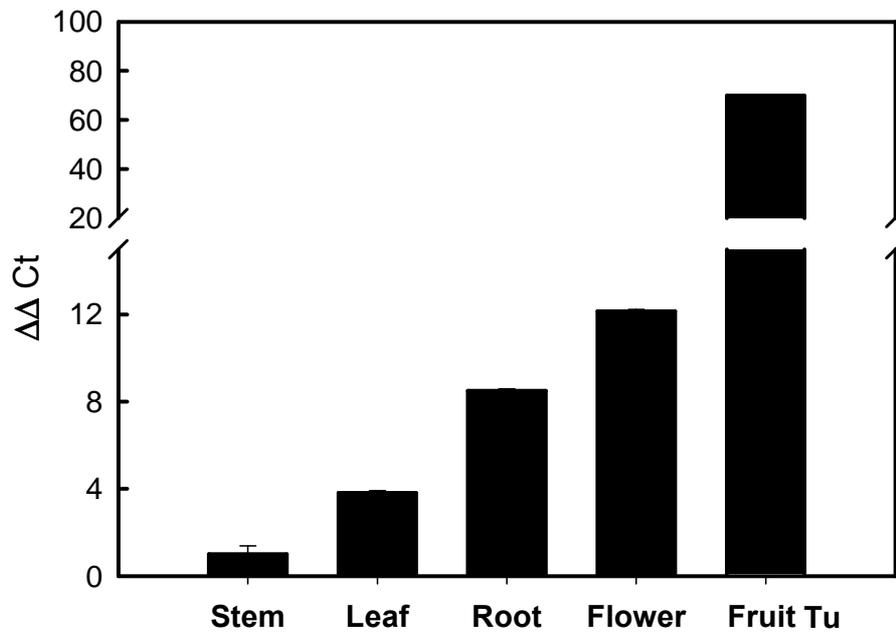


Figure I 2: Levels of *LeEF-Ts_{mt}* transcripts in various organs of tomato of the Ailsa Craig variety assessed by real-time PCR. The X-axis represents various organs of tomato stem, leaf, root, flower and fruit at Tu (turning stage). $\Delta\Delta Ct$ in the Y-axis refers to the fold difference in *LeEF-Ts_{mt}* expression relative to stems. Values are the mean of 3 replicates $\pm SE$

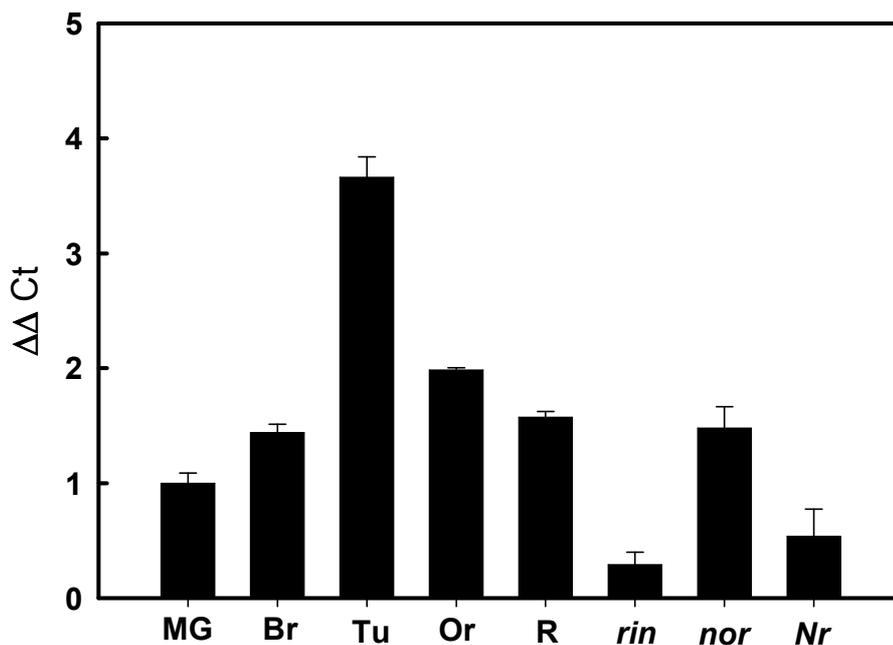


Figure I. 3: Levels of *LeEF-Ts_{mt}* transcripts during ripening of Ailsa Craig tomatoes and in ripening mutants (*rin*, *nor* and *Nr*) assessed by real-time PCR. The X-axis represents various stages of fruit ripening (MG= mature-green; Br= breaker; Tu = turning; Or = orange and R = red) and ripening mutants collected 70 days after anthesis. $\Delta\Delta Ct$ in the Y-axis refers to the fold difference in *LeEF-Ts_{mt}* expression relative to MG stage. Values are the mean of 3 replicates $\pm SE$.

3.3. *LeEF-Ts_{mt}* gene expression is stimulated in fruit by ethylene, wounding and temperature shocks

Since ethylene is known to control respiratory activity, the ethylene responsiveness of the gene was further assessed upon ethylene and 1-MCP treatment of fruit and upon wounding and temperature shock. Figure I. 4 indicates that ethylene treatment of mature-green of Ailsa Craig tomato fruit results in almost a 3-fold increase in transcript accumulation after 15 min. Accumulation was somewhat lower after 5 hours. Fruit treated with 1-MCP showed reduced expression (about half of the control) indicating that ethylene plays an important role in the stimulation of *LeEF-Ts_{mt}* expression. Wounding, which is known to stimulate both ethylene production and respiration, resulted in a 3.5-fold stimulation of *LeEF-Ts_{mt}* gene expression after 72 hours in mature-green Micro-Tom tomato fruit (Fig.I 5A). Stimulation was prevented by treating wound fruit tissues with 1-MCP indicating that the bulk of wound-induced stimulation of *LeEF-Ts_{mt}* gene expression is mediated by ethylene. Since the *LeEF-Ts_{mt}* gene has been isolated by mRNA differential display on the basis of ethylene response (Zegzouti et al.,1999), these data represent a new demonstration of the role of ethylene in regulating *LeEF-Ts_{mt}* gene expression.

In considering the role of ethylene in abiotic stresses, an assessment was made of the effect of temperature shocks on Micro-Tom fruit. Figure 5B indicates that continuous application of low (4°C) or high (30°C) temperatures had no effect on *LeEF-Ts_{mt}* RNA accumulation. However, fruits that were first stored at 4°C for 6 days and then transferred to 30°C for 2 hours showed strong stimulation of gene expression.

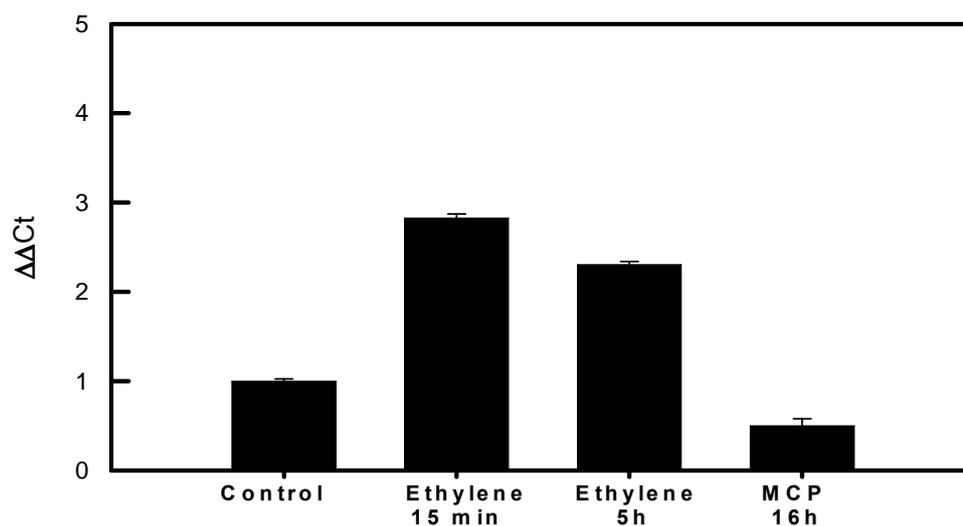


Figure I. 4: Effects of treating Ailsa Craig MG fruit with ethylene and 1-MCP on the levels of *LeEF-Ts_{mt}* transcripts assessed by real-time PCR. The X-axis represents control fruit, fruit treated for 15min and 5h with 50μl l⁻¹ ethylene and fruit treated with 1μl l⁻¹ 1-MCP for 16h. ΔΔCt in the Y-axis refers to the fold difference in *LeEF-Ts_{mt}* expression relative to untreated control fruit. Values are the mean of 3 replicates ± SE

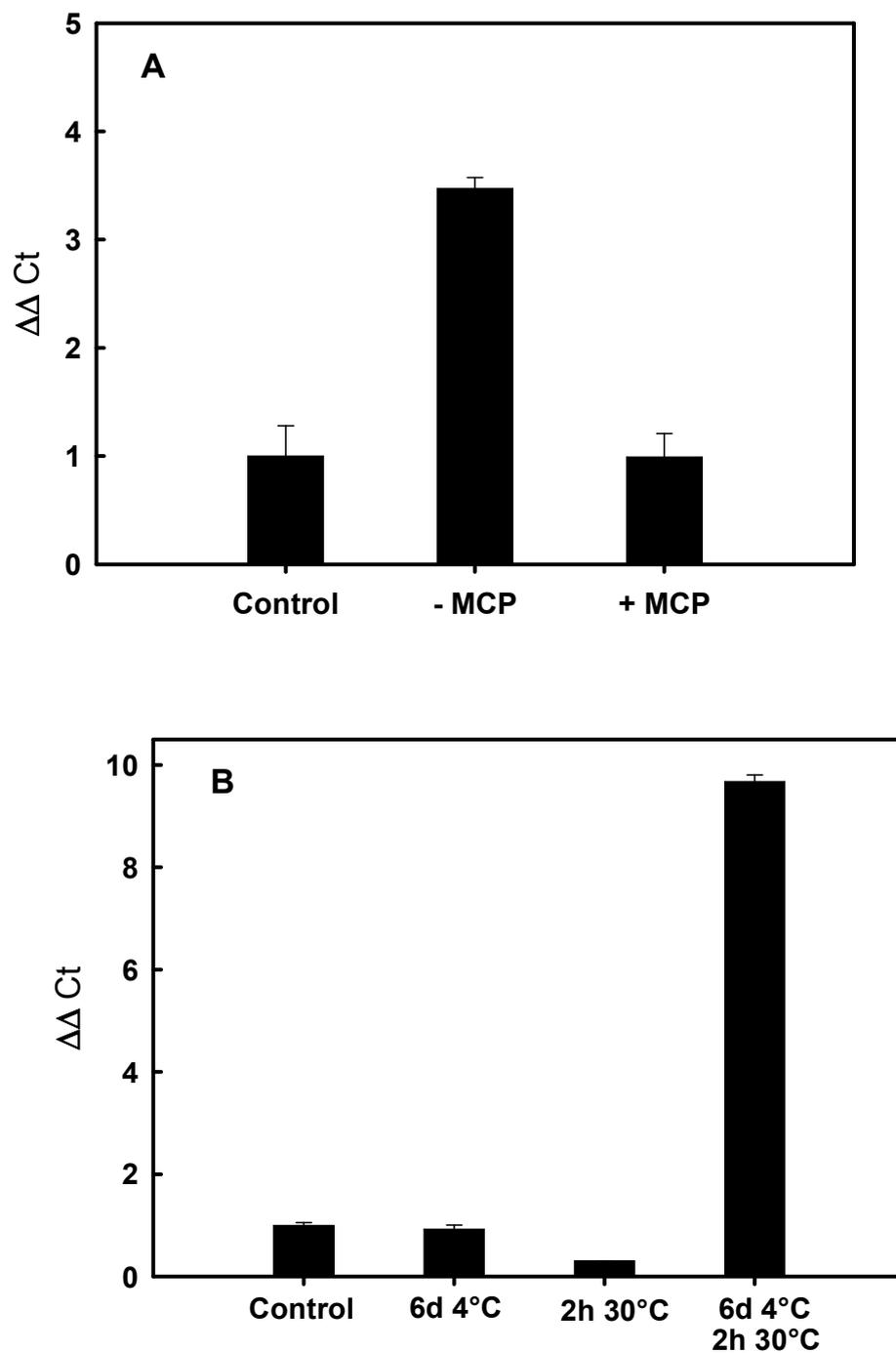


Figure I. 5: Effects of wounding in the presence or absence of 1-MCP (A) and temperature treatments (B) on the levels of LeEF-Ts_{mt} transcripts assessed by real-time PCR in Micro-Tom tomato fruit at the breaker stage. Wounding, 1-MCP and temperature treatments were performed as described in 'Material and Methods'. $\Delta\Delta Ct$ in the Y-axis refers to the fold difference in LeEF-Ts_{mt} expression relative to untreated control fruit. Values are the mean of 3 replicates $\pm SE$

3.4. Physiological characterisation of sense and antisense *LeEF-Ts_{mt}* plants

In order to address the function of the *LeEF-Ts_{mt}* gene *in planta*, transgenic tomato plants of the Micro-Tom genotype were generated and brought to homozygosity by successive self-pollinations. Among the various lines generated, two sense lines showed strong over-expression (up to 60 times in line S8/22) in the leaves, while two antisense lines showed moderate reduction of gene expression, specially the AS 77/11 line (Fig.I. 6A). The reduction in the levels of transcripts is similar in AS leaves and fruit at the turning stage with about 40% and 30% reduction, respectively (Fig.I. 6B).

Respiratory activity of untransformed (Wild Type, WT) and up- (S) and down-regulated (AS) Micro-Tom tomato fruit was evaluated after harvesting fruit at the mature-green stage and ripening at 25°C. Figure I. 7A shows a smooth climacteric respiratory rise in all type of fruit without any statistical difference between WT, S and AS fruit. In addition, the climacteric rise in ethylene production was not significantly affected by the genetic transformation in both intensity and timing (Fig.I. 7B), indicating that the overall ripening process remained unchanged. An attempt was made to strongly stimulate respiratory activity by wounding of mature-green fruit tissues. Although wounding resulted in about 3-fold stimulation of respiration (Fig. I 7C) and 20-fold stimulation of ethylene production (Fig. I. 7D), no difference could be observed between WT fruit and S and AS fruit.

It has been proposed that cyanide-insensitive respiration plays a major role in the climacteric respiration (Solomos, 1977; Pirrung and Brauman, 1987; Kumar et al., 1990). Therefore, the expression of the alternative oxidase (*AOX*) gene was evaluated in WT, S and AS ripening fruit. Figure I. 8 clearly indicates that the amount of *AOX* mRNA is increasing similarly in WT, AS and S fruit during ripening.

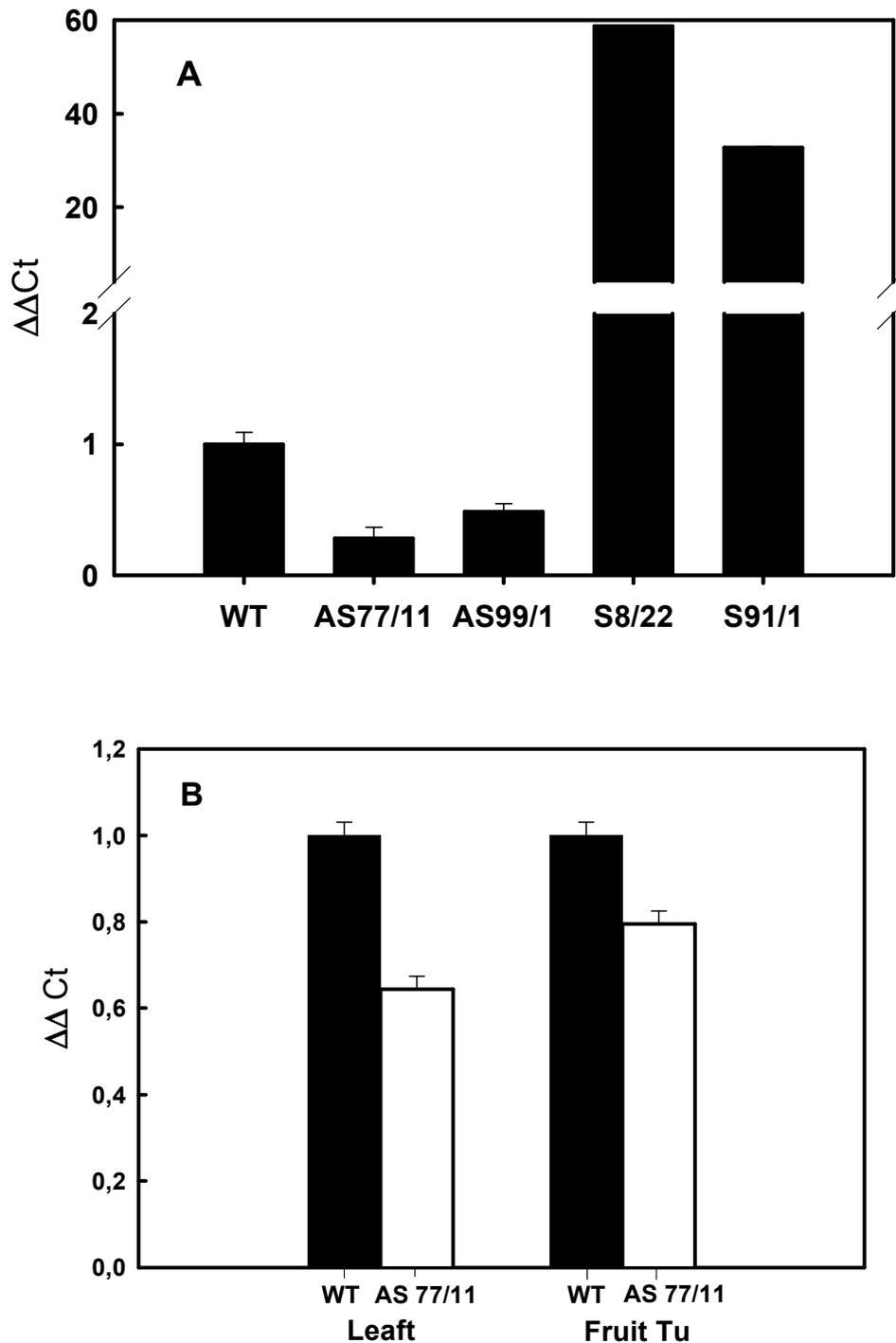


Figure I 6: Expression of the *LeEF-Ts_{mt}* gene in wild type (WT), sense (S) and antisense (AS) in leaves (A) and leaves and fruit at the turning stage (B) of *Micro-Tom* tomato plants. The level of *LeEF-Ts_{mt}* transcripts were assessed by real-time PCR. $\Delta\Delta Ct$ in the Y-axis refers to the fold difference in *LeEF-Ts_{mt}* expression relative to WT leaves (A) and WT leaves or fruit (B). Values are the mean of 3 replicates $\pm SE$

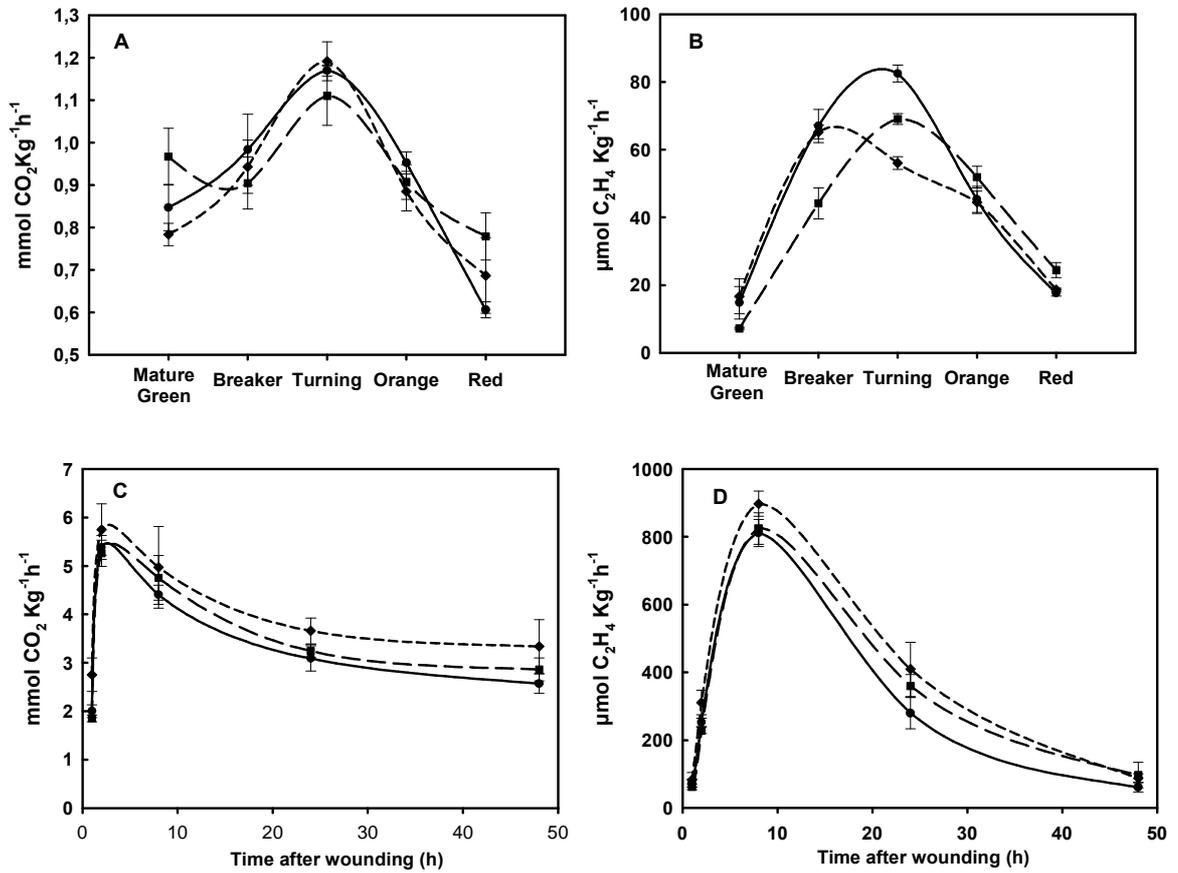


Figure I.7: Respiration and ethylene production of WT Micro-Tom fruit (◆) and transgenic fruit in which the *LeEF-Ts_{mt}* gene has been over (●) or down-regulated (■). CO₂ production of whole (A) and wounded fruit (C). Ethylene production of whole (B) and wounded (D) fruit. Each data represents the mean of 5 replicates ± SE.

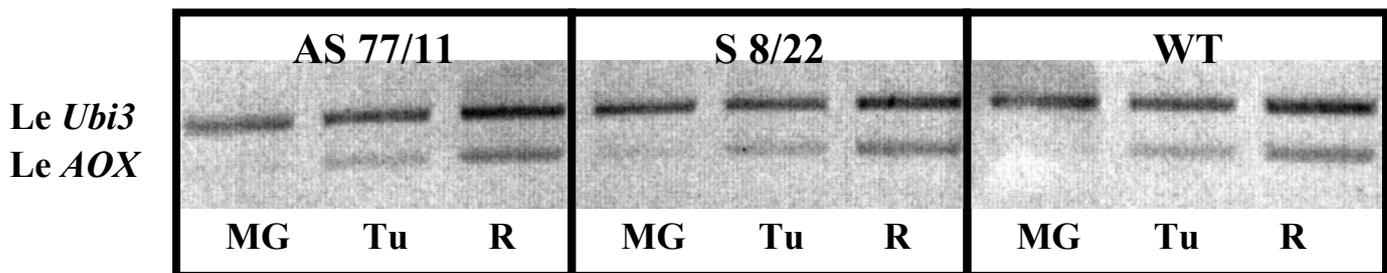


Figure I.8: RT-PCR analysis of *LeAOX* transcript accumulation in wild type (WT), sense (S) and antisense (AS) Micro-Tom tomato fruit at the MG, Tu and R stages. In each sample, the internal reference *LeUbi3* was co-amplified with the cDNA as described in Experimental procedures.

4. Discussion and conclusion

The up-regulation of the *LeEF-Ts_{mt}* gene during fruit ripening suggest that the protein synthesis machinery of the mitochondria is stimulated. A stimulation of the translation machinery for nuclear encoded proteins is well documented during fruit ripening (Brady, 1984). To our knowledge, changes in the translation machinery in the mitochondria has never been evaluated. Cytosolic elongation factors of the EF-Tu type are generally considered as constitutively expressed, including during fruit ripening of tomato (Bartley, 2003) and strawberry (Wilkinson, 1995) but nothing is known on the mitochondrial EF-Tu in plants. No information is available on elongation factors of the EF-Ts type. *LeEF-Ts_{mt}* is the first mitochondrial elongation factor characterised in plants (Benichou et al., 2003). The *LeEF-Ts_{mt}* gene has been isolated on the basis of the response to the plant hormone ethylene (Zegzouti et al., 1999). It encodes a functional elongation factor involved in providing energy for the synthesis of proteins in the mitochondria (Benichou et al., 2003). Knowing the essential role of ethylene in the stimulation of the respiration, it was hypothesised that *LeEF-Ts_{mt}* could play a role in the respiratory rise accompanying climacteric fruit. This hypothesis is supported by the high expression of *LeEF-Ts_{mt}* in fruit as compared to other plant tissues and by its up-regulation during the first steps of the ripening process. Ethylene stimulates and 1-MCP partially inhibits *LeEF-Ts_{mt}* expression in fruit. However non-ripening mutants exhibit significant expression indicating that the gene has a basal constitutive expression which is ethylene independent. Wounding of fruit tissues, which is known to greatly enhance respiration (McGlasson and Pratt, 1964) also stimulates *LeEF-Ts_{mt}* gene expression in a partial ethylene-dependent manner as well as temperature shocks. The stimulation of the translation mitochondrial machinery via the up-regulation of the *LeEF-Ts_{mt}* gene could correspond to an adaptation of the mitochondrial protein complexes to the hosting of increased levels of imported proteins that are know to be stimulated during ripening and upon ethylene action such as the alternate oxidase and uncoupler protein. The peculiar expression pattern of *LeEF-Ts_{mt}* gene prompted us to generate transgenic tomatoes in which the *LeEF-Ts_{mt}* gene was up- or down-regulated. Despite a strong difference in *LeEF-Ts_{mt}* gene expression between transgenic mutants and control fruit, the respiratory activity of either intact or wounded fruit remained unaffected. Since the gene is present in single copy in the tomato genome, the absence of effect on respiration cannot be attributed to a compensation by an homolog gene. A possible explanation is that the down-regulation of the gene was not sufficient to render the *LeEF-Ts_{mt}* protein limiting of the protein synthesis process.

Transgenic lines with complete inhibition of the gene may not be viable and may have been deleted during the transformation procedure. This hypothesis is supported by the fact that all *Arabidopsis* plants mutated for this gene are mutated in introns and never in the open-reading frame of the *AtEF-TS_{mt}* gene (The Arabidopsis Information Resource, <http://arabidopsis.org/>), indicating that the absence of transcription of the protein is probably lethal. The absence of effect on respiration could also be related to the presence of regulatory processes that would prevent the alteration of such an important function in plants. Some chaperon proteins of the heat-shock (Hs) type are known to be involved in the transport of nuclear-encoded proteins from the cytosol to the mitochondria (Kang et al., 1990) and in stabilizing the target protein under stress conditions (Jinn et al., 1995). Interestingly, a gene encoding an Hsp70 type of proteins, named *ER21*, is ethylene-regulated and exhibits a pattern of expression which is similar to *LeEF-TS_{mt}* (Zegzouti et al., 1999). It can be speculated that these proteins regulate the transport and/or the stability of the *LeEF-TS_{mt}* protein so as to modulate the turn-over of the protein and thus extend the energy supplying function for protein synthesis under stress conditions or when the level of *LeEF-TS_{mt}* protein is decreasing. However, we have so far no information on variation of the *LeEF-TS_{mt}* protein under stress conditions in WT and AS plants. In any case, these data show that, despite a strong effect of ethylene, the respiratory activity of mitochondria appears to be unaffected by variations of the expression of the *LeEF-TS_{mt}* gene. The regulation of respiration would rather depend upon a signal transmitted to the nucleus for enhancing the expression of genes such as the alternative oxidase or the uncoupling protein (Almeida et al., 1999; 2002). Further work is needed (i) to determine whether changes in the expression of *LeEF-TS_{mt}* result in alterations of the synthesis of proteins in the mitochondrion, (ii) to understand the role of ethylene in stimulating *LeEF-TS_{mt}* expression and (iii) to know whether post-translation regulatory processes exist that prevent the synthesis of proteins in mitochondrion from alteration.

Acknowledgements

The authors wish to thank P. Maury and O. Berseille for their participation in the determination of respiratory activity and RNA extractions respectively. H. Mondies and L. Tessarotto provided excellent technical assistance for the generation the transgenic plants. Agrofresh provided 1-MCP. This research was partly supported by the Midi-Pyrénées Regional Council (grants n°01008920 and 03001146). C.L. Girardi and A. Chavez received a bursary from the government of Brazil (CAPES). F. Jaimes-Miranda and K. Bermudez received a doctoral and postdoctoral fellowship, respectively, from the government of Mexico (CONACYT). C.L. Girardi is from EMBRAPA UVA E VINHO (Bento Gonçalves, RS, Brazil) and this work represents some of the research submitted in partial fulfilment of the requirements for its doctorate degree.

References

- Abeles, F.B., Morgan, W.B., Saltveit, M.E. Jr., 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego.
- Alba, R., Payton, P., Fei, Z., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G.B., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J., 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17, 2954–2965.
- Almeida, A.M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A.E., Sluse, F.E., 1999. Cyanide-resistant, AT-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during post-harvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiol.* 119, 1323-1329.
- Almeida, A.M., Navet, R., Jarmuszkiewicz, W., Vercesi, A.E, Sluse-Goffart, C.M., Sluse, F.E., 2002. The energy-conserving and energy-dissipating processes in mitochondria isolated from wild type and nonripening tomato fruits during development on the plant. *J. Bioenerg. Biomem.* 34, 487-498.
- Bartley, G.E. ; Ishida, B.K., 2003. Developmental gene regulation during tomato fruit ripening and in-vitro sepal morphogenesis. *BMC Plant Biology*, 3:4, 1-11.
- Benichou, M., Li, Z.-G., Tournier, B., Chaves, A., Zegzouti, H., Jauneau, A., Delalande, C., Latché, A., Bouzayen, M., Spremulli L., Pech, J.C., 2003. Tomato EF-TSmt, a functional mitochondrial translation elongation factor from higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 53, 411-422.
- Brady C.J. 1987. Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:155-178.
- Chen, Y.-F., Randlett, M.D., Findell, J.L., Schaller, G.E., 2002. Localisation of ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 19861-19866.
- Considine, M.J., Daley, D.O., Whelan, J., 2001. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiol.* 126, 1619-1629.
- Cruz-Hernandez, A., Gomez-Lim, M.A., 1995. Alternative oxidase from Mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* 197,569-576.
- Diolez, P., de Virville, J., Latché, A., Pech, J.C., Moreau F., Reid M.S., 1986 Role of the mitochondria in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in plant tissues. *Plant Sci.* 43, 13-17.
- Felsenstein, J., 1992. PHYLIP (Univ. of Washington, Seattle), Version 3.5.
- Holtzapffel, R.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Badger, M.R., Day, D.A., 2002.

- Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold-storage. *Funct. Plant Biol.* 29, 827-834.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem.* 23, 403-405.
- Jinn, T.L., Chen, Y.M., Lin, C.Y., 1995. Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat-shock protein complex in soybean. *Plant Physiol.* 108,693-701.
- Jones, B., Frasse, P., Olmos, E., Zegzouti, H., Li, Z.-G., Latché, A., Pech, J.C., Bouzayen, M., 2002. Down-regulation of an ARF-like gene in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark-green and blotchy ripening fruit. *The Plant J.* 32, 603-614.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A., Pfanner, N., 1990. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137-142
- Kumar, S., Patil, B.C., Sinha, S.K., 1990. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 818-822.
- McGlasson, W.B., Pratt, H.K., 1964. Effects of wounding on respiration and ethylene production by Cantaloupe fruit tissue. *Plant Physiol.* 39, 128-132.
- Merrick, W C., 1992. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 56, 291-315.
- Page, R.D.M., 1996. TREE VIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Pirrung, M., Brauman, J.I., 1987. Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis. 25, 55-61.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Solomos, T., 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 279-297.
- Wilkinson, J.G., Lanahan, M.B., Conner, T.W., Klee, H.J, 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology*, 27: 1097-1108.
- Zegzouti, H., Jones, B., Frasse, P., Marty, C., Maitre, B., Latché, A., Pech, J. C., Bouzayen,

M., 1999. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *The Plant J.* 18, 589-600.

CHAPITRE II

EFFETS DE LA SUR OU SOUS-EXPRESSION DU GENE *LeEF-Ts_{mt}* SUR LA REPONSE AUX STRESS OXYDATIFS DES PLANTES DE TOMATE

1. INTRODUCTION

Il est établi que les stress abiotiques tels que la blessure, les chocs thermiques, l'exposition à l'ozone stimulent l'activité respiratoire des plantes. Par ailleurs, ces stress conduisent à un déséquilibre de la production d'espèces réactives d'oxygène, ROS (Scandalios, 2002). Or la mitochondrie via l'activité de la chaîne respiratoire est une des sources importantes d'espèces réactives d'oxygène. Les mécanismes de production de ROS et leur régulation ont fait l'objet d'une mise au point en 2001 (Møller, 2001). Les autres sources majeures de ROS chez les plantes sont les chloroplastes et les péroxysomes (Apel et Hirt, 2004).

Pendant la respiration l'oxygène moléculaire subit une réduction au niveau des sites de régénération des ROS que sont les complexes I et III de la chaîne respiratoire. Il en résulte la formation de superoxyde qui est ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène. En raison de l'effet toxique des ROS sur le métabolisme, les plantes possèdent des systèmes de défense pour lutter contre une production excessive de ces espèces moléculaires. Ces systèmes antioxydatifs comprennent des composés tels que l'acide ascorbique et le glutathion, l' α -tocophérol et les caroténoïdes, mais également un ensemble d'enzymes fonctionnant de façon coordonnée et capables d'éliminer les espèces à radicaux libres. Le système peut être décrit de façon schématique de la façon suivante (Figure II-1)

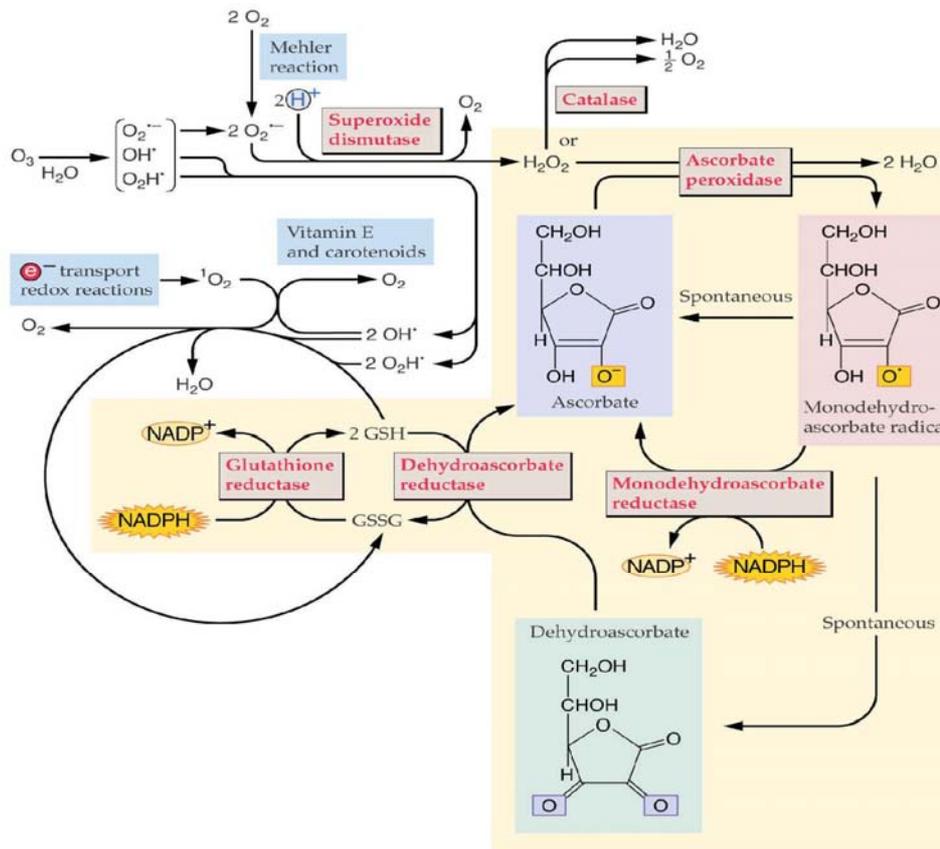


Figure II-1 : Mécanismes de détoxification cellulaire. (Buchanan, 2000)

La Superoxide dismutase (SOD) piège l'anion superoxide conduisant à la formation d' H_2O_2 qui peut être éliminé par la catalase (CAT) ou par l'ascorbate peroxidase (APX) en formant de l'eau et de l'oxygène. Le glutathion réduit le dehydroascorbate en ascorbate. La Glutathione Reductase (GR) réduit le glutathion oxydé.

Etant donné l'implication des mitochondries dans la régulation de la formation des ROS il est envisageable que la modification de la synthèse des protéines mitochondriales affecte la réponse des plantes aux stress oxydatifs. Ce chapitre est consacré tout d'abord à l'évaluation de l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* sous l'effet de différents stress oxydatifs appliqués aux parties végétatives de la plante: chocs thermiques, sécheresse et paraquat. Le paraquat (methyl viologen dichloride hydrate) est un herbicide non sélectif, utilisé en application sur les feuilles et dont l'efficacité nécessite lumière et chlorophylle. Il est reconnu que le paraquat exerce son action toxique en catalysant le transfert d'électrons du photosystème I du chloroplaste vers l'oxygène conduisant à la formation d'anion superoxide (Farrington et al., 1973). Nous avons ensuite évalué la sensibilité aux stress oxydatifs des feuilles et des cals des différentes lignées S et AS. Enfin, l'activité de différentes enzymes connues pour intervenir dans la détoxification des ROS (SOD, CAT, PX, GR) a été mesurée dans les feuilles des différentes lignées transformées (S et AS) et des plantes témoins (WT).

2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 - Matériel végétal

Les expériences de réponse aux stress oxydatifs ont été réalisées sur des plantes de tomate des variétés Micro-Tom et Aisla Craig. Les plantes transgéniques en orientation sens et antisens ont été obtenues après transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. La région codante du gène *LeEF-Ts_{mt}* a été amplifiée par PCR en utilisant la Vent polymérase (New England Biolabs) à l'aide des amorces suivantes : forward CCTCCTGATTAGCATCACAGATC et reverse ATCAAGCAGCATTAGCCAAAGG. Ce fragment a ensuite été introduit dans le vecteur binaire PGA643 en orientation sens et antisens et sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et du terminateur Nos. Les plantes transgéniques ont été sélectionnées sur la base de la résistance à la kanamycine (70 mgL⁻¹). Des plantes homozygotes de la génération R2 et des générations suivantes ont été utilisées pour la comparaison aux plantes non transformées. Les plantes ont été cultivées dans un phytotron sous conditions contrôlées de photopériode (14^h jour/8^h nuit), de température (25 °C), d'humidité (80%) et de luminosité (250 μE.s⁻¹.m⁻²).

2.2 - Application des stress

2.2.1- Traitement avec Paraquat

Les plantes de la variété Micro-Tom ont été traitées avec une solution de 50μM Paraquat (methyl viologen dichloride hydrate ,Sigma) auquel on a ajouté du Tween 20 (0,1% v/v) comme fixateur. Cette solution a été pulvérisée de façon homogène sur les feuilles jusqu'à formation de gouttes. Les plantes ont été placées ensuite en condition de lumière constante à 25°C. Les feuilles de chaque plante ont été rassemblées dans leur intégralité à 0 heure (contrôle), 5, 21, 29 et 48 heures après traitement et congelées immédiatement dans l'azote liquide. Chaque plante a constitué 1 répétition avec 5 répétitions par intervalle d'évaluation.

2.2.2 - Traitement Sécheresse

Des plantes Micro-Tom ont été cultivées en phytotron jusqu'au stade 4-5 feuilles. Le traitement a consisté en l'arrêt de l'irrigation pendant une période de 8 jours. A ce stade, les plantes présentaient un flétrissement marqué et des tests préliminaires en RT-PCR ont montré une forte augmentation de l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}*. Les échantillons (5 répétitions) ont été congelés dans l'azote liquide et stocké à -80°C.

2.2.3 - Traitement à la Chaleur

Des plantes de la variété Micro-Tom au stade 4-5 feuilles ont été placées dans une étuve (Memmert) à 45°C pendant 6 heures. Les échantillons ont été congelés dès la sortie de l'étuve.

2.3 – Dosage des activités enzymatiques

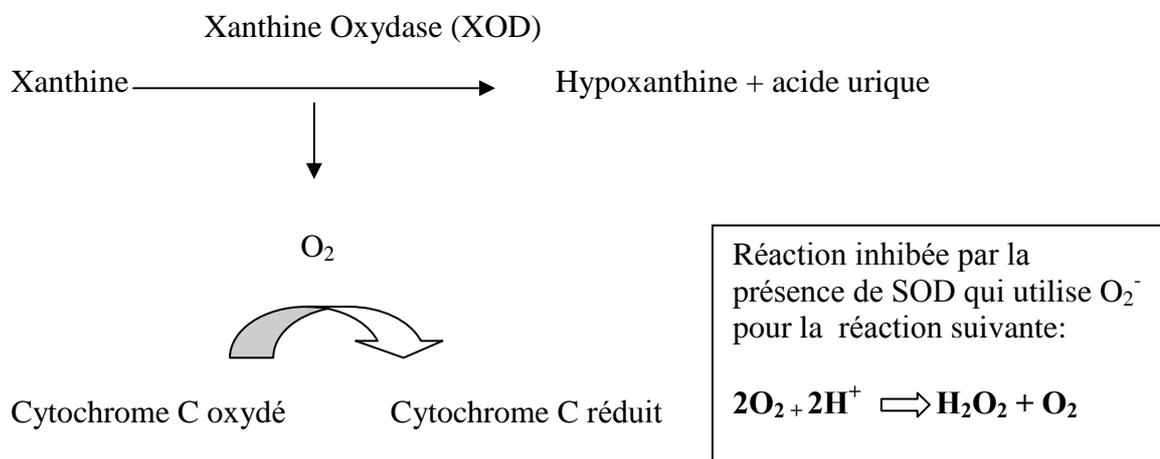
2.3.1 - Extraction et dosage des protéines

Un gramme de feuilles congelées ont été broyé dans l'azote liquide avec 4 mL de tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 7,8) contenant 1 mM d'EDTA, 1 mg/mL de DTT et 1 mM PMSF. Le PPVP qui est insoluble, a été ajouté séparément (20 mg par chaque échantillon). Après le broyage, le mélange est mis à décongeler dans la glace jusqu'à obtention d'une suspension visqueuse. Une première centrifugation à 2100 rpm pendant 3 min a été effectuée pour éliminer les plus gros débris. Le surnageant est repris et centrifugé à 20000 rpm pendant 20 min. Le surnageant qui représente la fraction soluble des protéines est repris et dessalé sur des colonnes Sephadex P10 (Pharmacia). Les échantillons ont été conservés à -20°C, jusqu'à la détermination des activités enzymatiques.

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le colorant bleu de Coomassie G250. On ajoute 5 µL d'extrait protéique à 200 µL de réactif de Bradford et 795 µL de tampon phosphate (pH 7,8). Puis on effectue la lecture d'absorbance à 595 nm au spectrophotomètre Beckman DU 640B. Le blanc est fait sur un échantillon auquel on n'ajoute pas d'extrait protéique. La concentration en protéines de l'échantillon est déterminé à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations connus (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1 mg/mL).

2.3.2 - Dosage de l'activité de la Superoxide Dismutase (SOD - CE 1.15.1.1)

La méthode utilisée est celle de McCord & Fridovich (1969). Cette méthode repose sur les usages compétitifs du radical superoxide O_2^- de plusieurs réactions. L'anion superoxide est produit par l'activité de la xanthine oxydase (XOD) qui transforme la xanthine en acide urique. La réduction du cytochrome c utilise O_2^- et cette réaction peut être quantifiée par la mesure d'absorbance à 550nm. L'activité de la SOD inhibe cette réaction par l'utilisation du O_2^- pour produire H_2O_2 . L'activité de la SOD est donc quantifiée en fonction du degré d'inhibition de la réduction du cytochrome C.



La mesure de l'activité enzymatique a été faite à 550 nm pour 2 min. 30 sec. ("délai" de 30 sec.) avec spectrophotomètre Beckman DU 640B dans tampon phosphate 0,05 M (pH 7,8) en contenant 50 μ M xanthine, 10 μ M cytochrome C et 0,1 mM EDTA . Le volume de xanthine oxydase à ajouter (0,015 Unités/mL) pour avoir une réduction du cytochrome C oxydé suffisant pour avoir l'ajustement de la solution substrat avec une D.O de 0,025/minute. Une unité d'activité SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50% la réaction du cytochrome c oxydé. Les activités sont exprimées en U/100 de protéines totales.

Calcul de la activité enzymatique : Avec le valeur obtenu dans lecture a 550 nm de la solution substrat et sur le échantillon, nous pouvons calculé la % d'inhibition de la réduction du cytochrome C pour la SOD.

$$\% \text{ Inhibition} = [(dAbs_{550/min})_{\text{contrôle}} - (dAbs_{550/min})_{\text{échantillon}}] / (dAbs_{550/min})_{\text{contrôle}} * 100$$

$(dAbs_{550/min})_{\text{contrôle}}$: différence de absorbance par minute avec la XOD

$(dAbs_{550/min})_{\text{échantillon}}$: différence de absorbance pour minute avec la XOD et échantillon

L'activité de l'enzyme SOD est calculée utilisant la formule suivante:

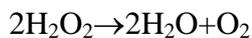
$$U \text{ SOD /ml} = (\% \text{ inhibition}/50 V_E) f$$

V_E = volume échantillon utilisé pour faire mesure en μL

f = facteur de dilution utilisé, si provisoirement nous avons besoin de dilué l'échantillon pour rester dans une valeur voisine de 40% d'inhibition de la réduction du cytochrome C pour la SOD.

2.3.3 - Dosage de l'activité de la Catalase (CAT - CE 1.11.1.6)

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode décrite par Beers et Sizer (1952). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène du fait de l'activité de la catalase selon la réaction suivante :



On prépare une solution substrat composée de 60 mL de tampon phosphate 0,05 M (pH 7,0) et de 0,1 mL de H_2O_2 à 30%. Cette solution doit avoir une absorbance entre 0,550 et 0,520 à la longueur d'onde de 240 nm. On mesure la baisse de l'absorbance à 240 nm sur un volume de 3 mL (2,950 mL de solution substrat et 50 μL d'extrait de protéines) pendant 1 min. et 44 sec après un temps d'attente de 20 sec. Le blanc est fait sur la même solution substrat auquel on a ajouté 50 μL de tampon phosphate.

Calcul de l'activité enzymatique :

$$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéine} = ((\text{Pente} \times \varepsilon) \times 1000 \times V_r) / (C \times V_s)$$

Pente = $d\text{Absb}_{240}/\text{min}$: différence d'absorbance par minute

ε : Coefficient d'extinction de H_2O_2 ($36 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$)

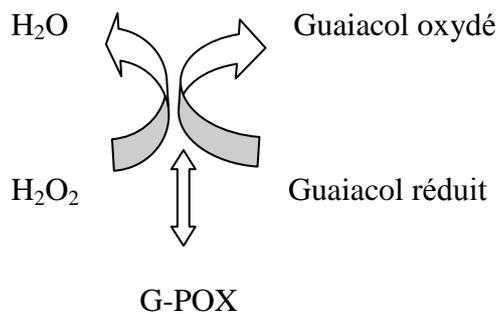
V_r : Volume de la réaction (ml)

C : Concentration en protéines de l'échantillon (mg/ml)

V_s : volume de l'extrait protéique (ml)

2.3.4 - Dosage de l'activité de la Guaiacol Peroxydase (G-POX - CE 1.11.1.7)

La méthode utilisée a été rapportée par Nickerson *et al.* (1993). Le principe de la détermination de cette enzyme réside dans l'utilisation du peroxyde d'hydrogène pour former un produit coloré en présence du guaiacol qui est dosé à 470 nm.



La **G-POX** transforme le substrat H_2O_2 en H_2O en oxydant le guaiacol.

La mesure a été réalisée dans un volume d'échantillon contenant 40 μ g de protéine, qui a été ajouté dans un volume de tampon d'acétate de sodium 50 mM (pH 5,0) pour un volume final 900 μ L. Dans ce mélange, on ajoute 100 μ L de guaiacol 2% puis 10 μ L de H_2O_2 . L'évolution de l'absorbance par minute a été mesurée à 470 nm après un temps d'attente de 5 sec. Le blanc est effectué sur le même mélange sans ajout d'extrait protéique.

Calcul de l'activité enzymatique :

$$\text{Abs}_{470}/\text{min.}/\text{mg protéine} = (\text{dAbs}_{470}/\text{min}) * V_r / 0,04$$

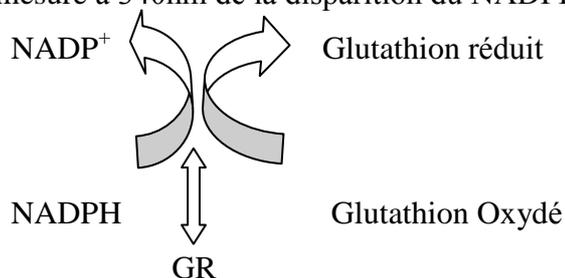
$\text{dAbs}_{470}/\text{min}$: différence d'absorbance pour minute (pente de la droite de linéarisation)

V_r : Volume de la réaction (ml)

0,04 : quantité de protéine dans réaction (mg)

2.3.5 - Dosage de l'activité de la Glutathione réductase (GR - CE 1.6.4.2)

La méthode utilisée a été rapportée par Edwards *et al.* (1990). Cette méthode est basée sur la mesure à 340nm de la disparition du NADPH oxydé lors de la réduction par la GR.



La **GR** transforme le substrat NADPH en $NADP^+$ en réduisant le glutathion qui est dans la forme oxydé.

Le mélange réactionnel contient 910 μL de tampon Hepes 0,1M (pH 7,8), 50 μL d'échantillon auquel on a ajouté du DTT (10 μl) et 20 μL de NADPH. La cinétique a été mesurée pendant 1 minute.

Calcul de l'activité enzymatique :

$$\text{nmoles NADPH/min./mg protéine} = ((\text{Pente} * \epsilon) * 1000 * V_r) / (C * V_s)$$

Pente = $d\text{Abs}_{340} / \text{min}$: différence d'absorbance par minute

ϵ : Coefficient d'extinction de NADPH ($6,22 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$)

V_r : Volume de la réaction (mL)

C : Concentration de protéine d'échantillon (mg/mL)

V_s : quantité de protéine dans réaction (μg)

3 - RESULTATS

3.1- Expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* dans les plantes transgéniques

La mise en oeuvre de la technique de PCR en temps réel nous a permis d'évaluer de façon précise l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* dans les plantes transformées avec une construction sens et antisens.

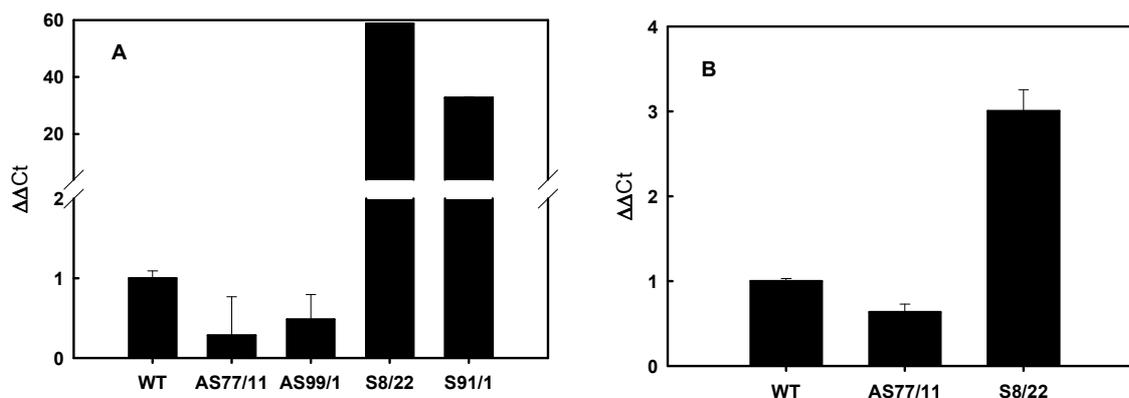


Figure II-2 : Expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* par PCR en temps réel dans des feuilles (A) et des cals (B) de tomates de la variété Micro-Tom sauvages (WT) ou transformées avec une construction antisens (lignées AS77/11 et AS99/11) ou sens (lignées S8/22 et S91/1). L'axe des abscisses représente les différentes lignées. L'axe des ordonnées correspond au $\Delta\Delta\text{Ct}$, c'est-à-dire à la différence d'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* par rapport au WT qui est affecté de la valeur 1. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions +/- Erreur Standard.

La figure II-2 montre que l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* est sensiblement réduite d'environ la moitié dans les 2 lignées antisens tant chez les feuilles que dans les cals. On remarque que la lignée AS77/11 est la plus inhibée dans les deux cas. Il est probable, que

compte-tenu de l'importance de ce gène dans le fonctionnement mitochondrial, les plantes transformées présentant une forte inhibition n'ont pas pu être sélectionnées soit parce qu'elles n'étaient pas viables, soit parce qu'elles avaient un développement fortement ralenti.

Les lignées transformées avec une construction sens, par contre présentent une très forte sur-expression du gène de près de 30 (lignée S91/1) à 60 fois (lignée S8/22) chez les feuilles et de 3 fois chez les cals de la lignée S8/22. La différence d'expression entre les feuilles et les cals pourrait être due à des degrés différents d'efficacité du promoteur 35S dans différents tissus, d'autant plus que les cals sont cultivés en présence de régulateurs de croissance.

3.2- Expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* en réponse à des stress abiotiques.

Les travaux du chapitre précédent ont montré que la blessure et les chocs de température stimulaient l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* chez les fruits. Nous avons voulu évaluer ici les effets de différents stress sur l'expression de ce gène dans les feuilles. La figure II-3 montre que l'application de températures élevée (45°C) a un effet très faible. Par contre, le paraquat, provoque un accroissement de 6 fois environ de l'expression de *LeEF-Ts_{mt}*. Quant à la sécheresse, elle a un effet encore plus marqué avec une stimulation de près de 10 fois. L'absence de stimulation par des températures de 30°C avait été observée chez les fruits où seuls les chocs thermiques (séjour à 4°C puis retour à 30°C) avaient un effet très net (Figure I-5, chapitre I.).

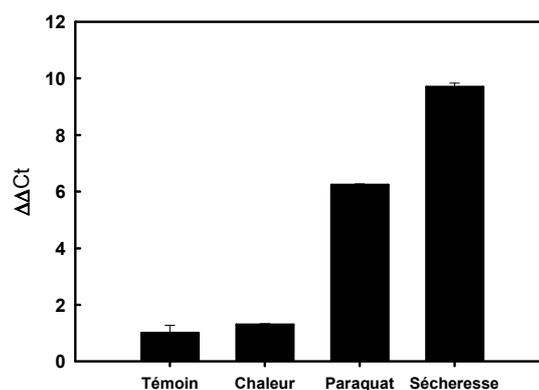


Figure II-3: Expression du gène *Le-EF-Ts_{mt}* par PCR en temps réel dans des feuilles de tomates sauvages (WT) de la variété Micro-Tom sous l'effet de différents stress abiotiques. L'axe des abscisses représente les différents types de stress dont l'application est décrite dans Matériel et Méthodes. L'axe des ordonnées correspond au $\Delta\Delta C_t$, c'est-à-dire à la différence d'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* par rapport au témoin ne subissant pas de stress qui est affecté de la valeur 1. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions +/- Erreur Standard.

3.3- Phénotypes des plantes de tomates sous ou sur-exprimant le gène *LeEF-Ts_{mt}* en réponse à des stress abiotiques.



Figure II-4 : Phénotype de brûlure périphérique des feuilles dans une plante de la lignée sens (367/8) de la variété Aisla Craig attribué à un traitement phytosanitaire. Noter l'absence de symptômes dans la lignée témoin (WT).

Lors d'une culture en phytotron de lignées témoins et sens, nous avons observé des symptômes de brûlures sur la périphérie des feuilles (Fig. II-4) uniquement dans le cas des plantes des deux lignées sens et pas dans les témoins. Nous ne disposons pas de lignées antisens chez Aisla Craig. Nous avons pensé que ces symptômes étaient dus aux traitements phytosanitaires. Un recensement des traitements a été fait. Les produits chimiques utilisés étaient les suivants : Benlate (benomil).

Cette observation nous a encouragés à rechercher de façon mieux contrôlée les effets de stress chimiques sur les plantes témoins et transformées. Notre choix s'est porté sur le paraquat qui est connu pour produire des espèces réactives d'oxygène et conduire à un stress oxydatif.

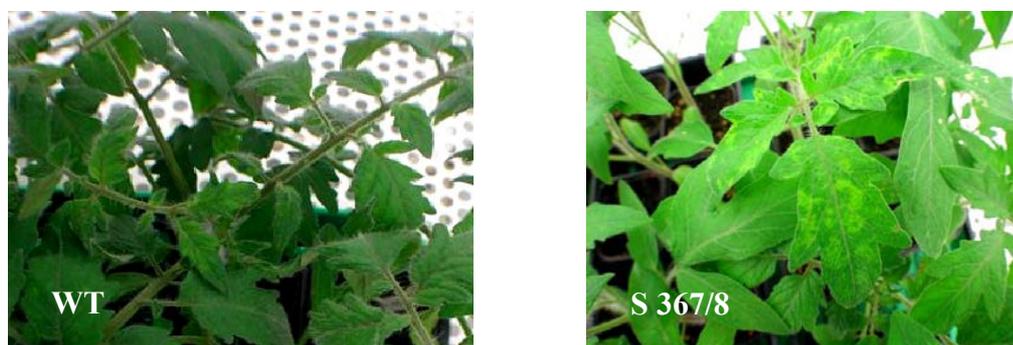


Figure II-5 : Phénotype de jaunissement sur des feuilles de la lignée sens (367/8) chez la variété Aisla Craig à la suite d'un traitement par pulvérisation au paraquat (50 μ M). Noter l'absence de symptômes dans la lignée témoin (WT).

Le traitement au paraquat a été réalisé par pulvérisation d'une solution à 50 μ M sur des plantes adultes. Environ 2 jours après le traitement, nous avons observé des tâches jaunes sur les feuilles des plantes sens uniquement (Figure II-5). Les plantes témoins (WT) ne présentaient aucun symptôme. Afin de procéder à une nouvelle vérification de ces observations, nous avons réalisé une expérience avec la variété Micro-Tom pour laquelle nous disposons de lignées sens et antisens. Les observations dans le cadre de cette expérience n'ont montré aucune différence de sensibilité au paraquat des lignées sens et antisens aux faibles doses (50 μ M) ou aucun symptôme n'apparaît, et à des doses plus élevées (100 μ M) où toutes les plantes étaient affectées de la même façon.

Nous avons également réalisé un autre type de stress consistant en une combinaison chaleur (6h 45°C) et sécheresse (8 jours sans irrigation). Dans ces conditions nous n'avons pas, non plus, observé de différences de sensibilité entre les lignées et les plantes en termes de date et intensité du flétrissement et en récupération après réhydratation.

3.4- Effets du paraquat sur le développement de cals de tomates WT, S et AS.

Il est possible que le type de matériel plante entière ne soit pas bien adapté pour permettre la discrimination des effets dose de paraquat en raison par exemple de l'interférence due à l'absorption du produit ou d'uniformité de la pulvérisation. Nous avons alors orienté notre étude vers un autre type de matériel constitué par des cals en culture *in vitro* des trois types de plantes : WT, S et AS.

Nous avons dans un premier temps recherché les doses de paraquat ajoutées au milieu de culture qui pouvaient provoquer des effets toxiques. La dose de 10 μ M s'est avérée très toxique, provoquant un arrêt total de la prolifération. Nous avons donc testé des doses inférieures allant de 2 à 8 μ M.

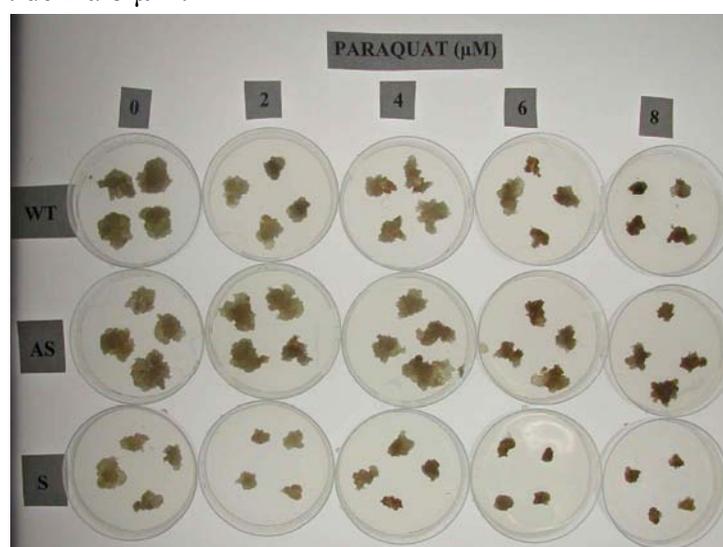


Figure II-6. Photographie de cals de tomates Micro-Tom WT, AS et S, soumis à des doses variables de paraquat dans le milieu de culture allant de 2 à 8 μ M.

La simple observation de la figure II-6 montre que l'effet négatif du paraquat sur la prolifération cellulaire est plus important dans les cals de la lignée sens. Les cals de la lignée AS sont les moins affectés et ceux de la lignée WT ont une sensibilité intermédiaire. Il semble donc que l'ordre croissant de sensibilité au paraquat est le suivant : Sens, WT et antisens.

Une analyse plus fine de la masse de matière sèche des cals dans les différentes conditions (Figure II-7) confirme la plus grande sensibilité des cals de la lignée S8/22, particulièrement visibles aux doses de 2 et 4 μM . Les cals de la lignée AS77/11 conservent une croissance en termes de matière sèche importante et supérieure aux autres types de cals jusqu'à la dose de 4 μM . Au-delà de 4 μM , la différence entre les types de cals est beaucoup moins marquée.

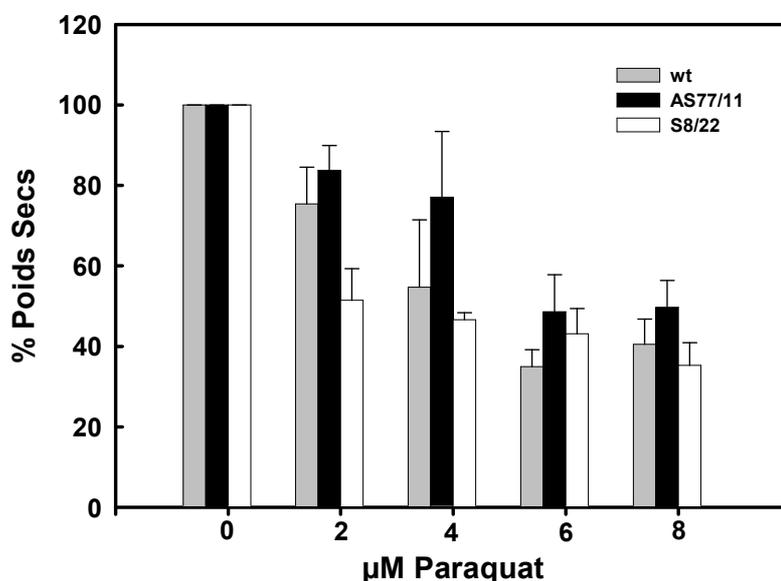


Figure II-7: Croissance de cals de tomates Micro-Tom WT, AS et S, soumis à des doses variables de paraquat dans le milieu de culture allant de 0 à 8 μM . Les résultats sont exprimés en pourcentage de la masse sèche des cals témoins (0 paraquat). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions \pm SD

3.5- Effets du paraquat sur l'activité de quatre enzymes intervenant dans les processus anti-oxydatifs chez des plantes témoins (WT) évaluée à des durées variables après traitement

Malgré l'absence de phénotype clair dû aux effets du paraquat, il est possible que la seule observation d'une toxicité foliaire ne soit pas suffisamment représentative. Etant donné le rôle du paraquat dans la génération de radicaux libres, nous avons évalué les effets de cette substance sur l'activité de certaines enzymes connues pour intervenir dans les stress oxydatifs, servant ici de marqueurs: catalase (CAT), glutathion réductase (GR), superoxyde dismutase (SOD) et peroxydase (PER).

Dans un premier temps nous avons mesuré l'activité de ces enzymes dans les feuilles de plantes WT à des durées variables après traitement afin de déterminer le temps de réponse optimal. La figure II-8 A à D montre que les activités de la SOD et de la GR évoluent faiblement entre 0 et 48h. Par contre l'activité CAT et PER augmentent sensiblement pour atteindre un maximum à 29h. Cette durée a été retenue pour comparer l'activité de ces enzymes dans les différentes lignées traitées au paraquat.

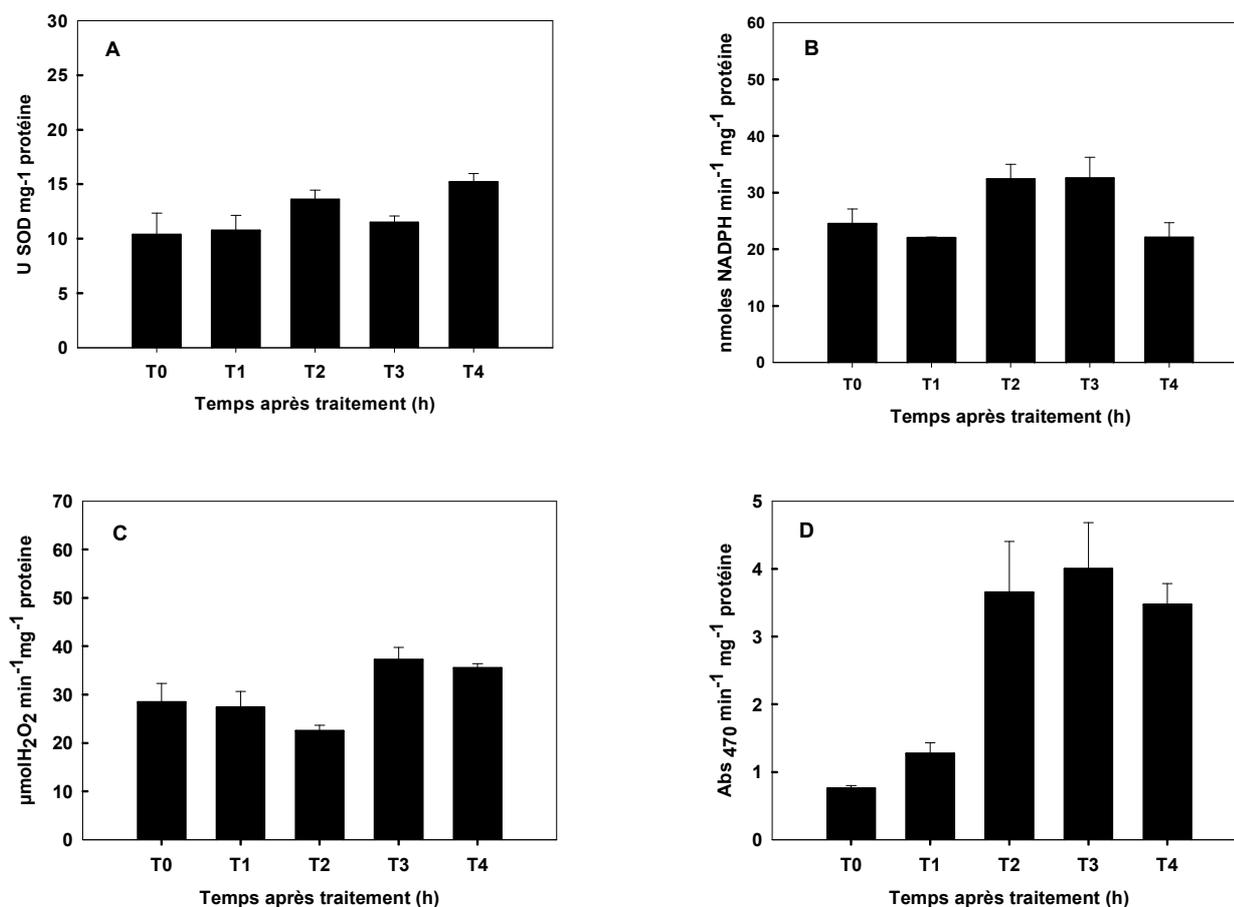


Figure II-8 : Activité de la superoxide dismutase (A), glutathion réductase (B), Catalase (C) et Guaïcol peroxydase (D) dans des feuilles de tomates Micro-Tom à des durées variables après un traitement par pulvérisation avec du paraquat à 50 μ M. Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 mesures indépendantes +/- Erreur Standard.

3.6- Activité de la catalase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.

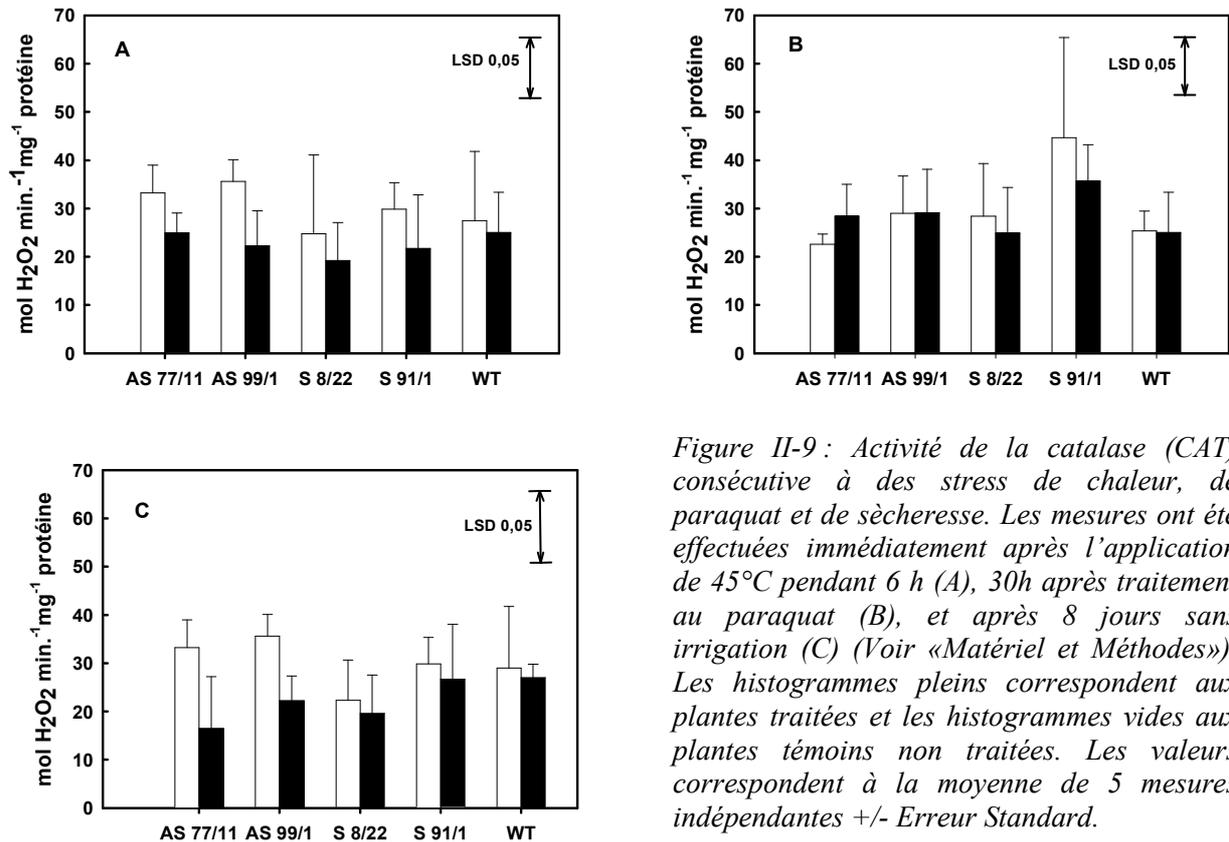


Figure II-9 : Activité de la catalase (CAT) consécutive à des stress de chaleur, de paraquat et de sécheresse. Les mesures ont été effectuées immédiatement après l'application de 45°C pendant 6 h (A), 30h après traitement au paraquat (B), et après 8 jours sans irrigation (C) (Voir «Matériel et Méthodes»). Les histogrammes pleins correspondent aux plantes traitées et les histogrammes vides aux plantes témoins non traitées. Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 mesures indépendantes +/- Erreur Standard.

La figure II-9 montre que l'activité catalase est dans tous les cas plus faible dans les feuilles stressées (histogrammes pleins) par la chaleur et la sécheresse que dans les feuilles non stressées (histogrammes vides). Toutefois, en raison d'une grande variabilité, ces différences ne sont pas statistiquement significatives. Par contre le traitement au paraquat donne des moyennes très voisines pour les feuilles traitées ou non. Par ailleurs, l'activité de la catalase est comparable dans les différentes lignées transformées (AS ou S) et dans les plantes WT.

3.7- Activité de la superoxyde dismutase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.

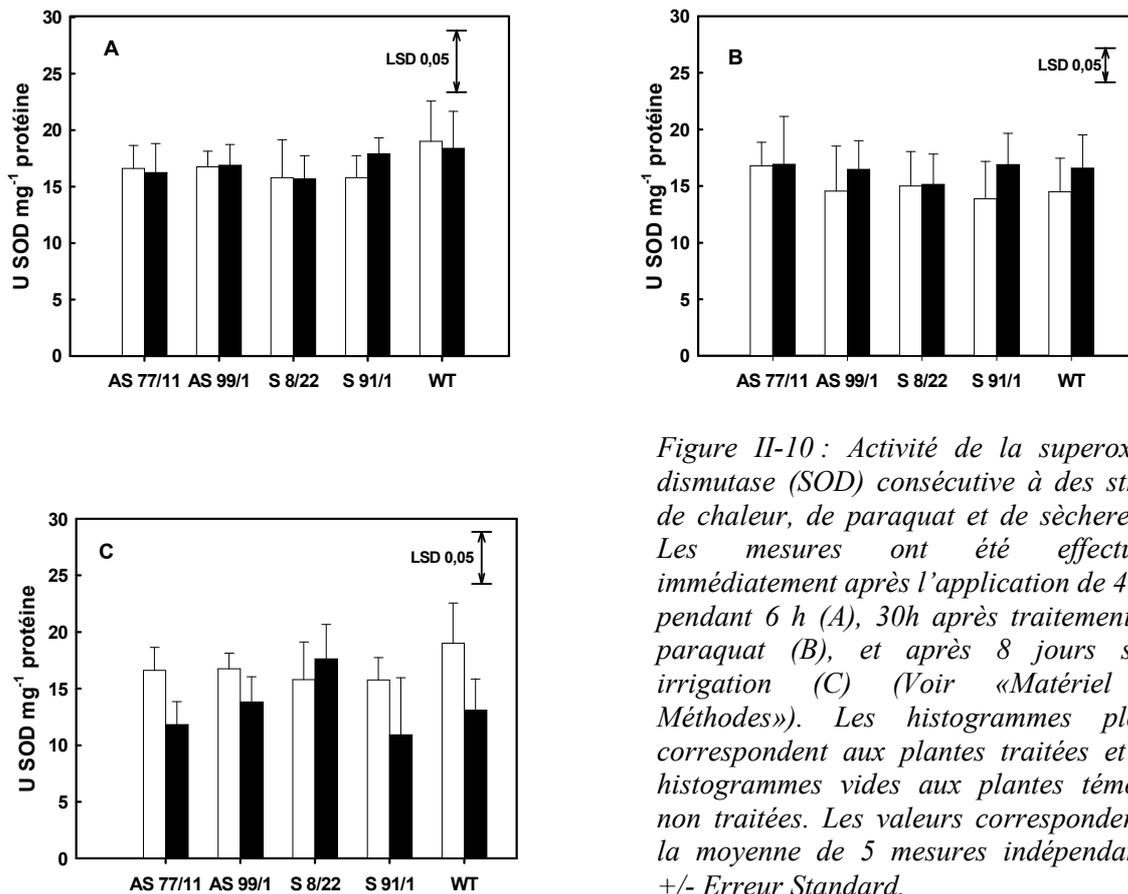


Figure II-10 : Activité de la superoxyde dismutase (SOD) consécutive à des stress de chaleur, de paraquat et de sécheresse. Les mesures ont été effectuées immédiatement après l'application de 45°C pendant 6 h (A), 30h après traitement au paraquat (B), et après 8 jours sans irrigation (C) (Voir «Matériel et Méthodes»). Les histogrammes pleins correspondent aux plantes traitées et les histogrammes vides aux plantes témoins non traitées. Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 mesures indépendantes +/- Erreur Standard.

Comme pour l'activité catalase, les différents stress appliqués n'ont pas d'effet sur l'activité de la superoxyde dismutase (histogrammes vides à comparer aux histogrammes noirs) et l'activité est comparable dans les différentes lignées transformées (AS ou S) et dans les plantes WT (Figure II-10).

3.8- Activité de la Glutathion réductase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.

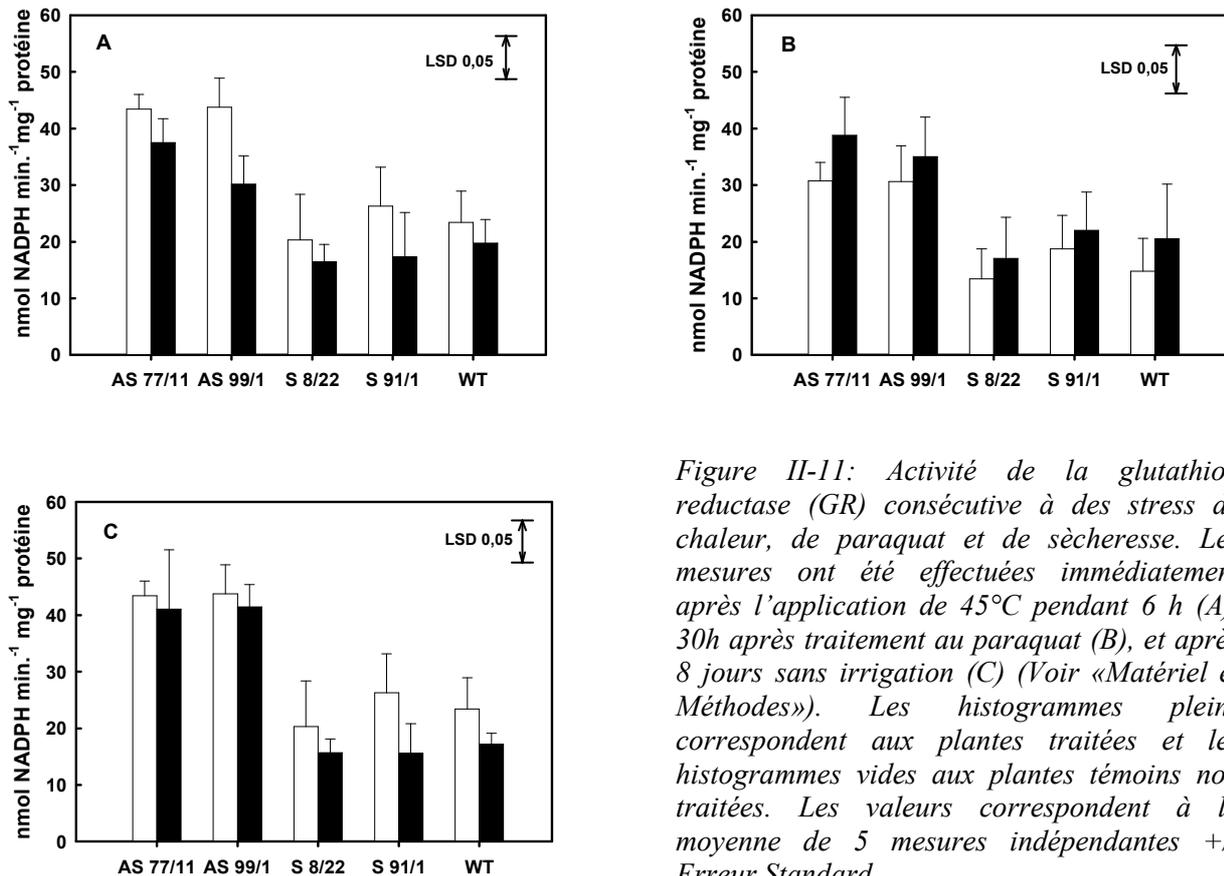
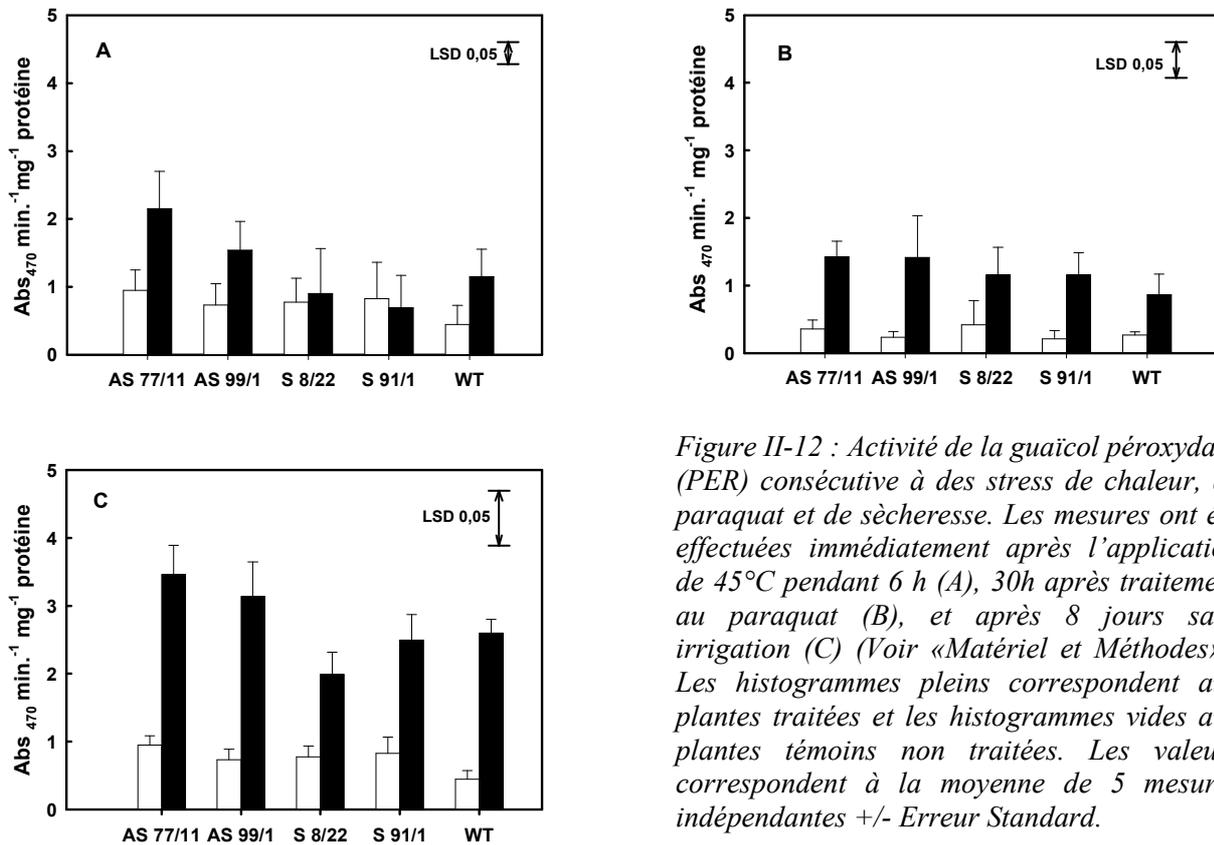


Figure II-11: Activité de la glutathion réductase (GR) consécutive à des stress de chaleur, de paraquat et de sécheresse. Les mesures ont été effectuées immédiatement après l'application de 45°C pendant 6 h (A), 30h après traitement au paraquat (B), et après 8 jours sans irrigation (C) (Voir «Matériel et Méthodes»). Les histogrammes pleins correspondent aux plantes traitées et les histogrammes vides aux plantes témoins non traitées. Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 mesures indépendantes +/- Erreur Standard.

Les différents stress appliqués n'ont pas d'effet sur l'activité de la glutathion réductase. Par contre, les lignées antisens présentent une activité significativement supérieure à celle des WT et S aussi bien dans les conditions standards qu'après application de stress (Figure II-11). Il est intéressant de noter que cette activité plus élevée des AS se retrouve pour toutes les conditions de stress appliquées. Il n'y a pas de différences entre les activités GR des lignées S et WT.

3.9- Activité de la Guaïcol peroxydase dans les plantes WT, AS et S en réponse à différents stress.



Contrairement aux activités évaluées jusque là, la guaïcol peroxydase est nettement stimulée par les 3 types de stress avec des activités 2 à 3 fois supérieures à celles des plantes témoins non traitées (Figure II-12). C'est le stress sécheresse qui affecte le plus fortement l'activité Per. De plus, dans le cas du traitement à la chaleur et de la sécheresse, les plantes des deux lignées AS réagissent par une activité PER significativement supérieure à celle des S et WT.

4- DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1- Expression du gène *LeEF-Ts_{mt}*

Un des résultats le plus remarquable de ce travail est la démonstration de la stimulation de l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* sous l'effet de divers stress. Nous n'avons noté cependant aucune stimulation sous l'effet de hautes températures seules comme dans le cas du fruit. Il aurait été intéressant de coupler l'application de températures élevées à un séjour préalable à basse température. Chez le fruit, ce type de traitement induit une forte stimulation de l'expression de *LeEF-Ts_{mt}* (Chapitre I). Aucune observation de ce type n'a pas été rapporté chez d'autres plantes, mais il faut rappeler cependant que *LeEF-Ts_{mt}* est le premier gène caractérisé chez les plantes (Benichou et al., 2003). Les seules données disponibles concernent la forte stimulation par la chaleur de l'expression d'un gène codant pour une protéine de type EF-Tu chloroplastique et de la protéine correspondante chez le maïs (Bhadula et al., 2001). Les protéines EF-TU ont une fonction est très étroitement liée à celle de EF-Ts en jouant le rôle de chaperonnes. Chez les bactéries les propriétés chaperones des EF-Tu ont été démontrées et leur interaction avec EF-Ts conduit à une plus forte activité du complexe (Caldas et al., 1998 ; Krab et al, 2001). On peut imaginer que des protéines chaperonnes de type EF-Tu ou autres varient en parallèle avec la protéine EF-Ts_{mt} au cours de stress. Ce problème est traité dans le dernier chapitre de cette thèse consacré à une étude protéomique des mitochondries.

4.2- Activités des enzymes en réponse aux stress

Dans ce travail, nous n'avons pas observé de variations marquées de l'activité de la SOD et de la GR avec le stress. L'activité de la catalase a tendance à baisser en situation de sécheresse et de fortes températures. Seule l'activité des peroxydases est largement augmentée en réponse aux différents stress et en particulier en réponse à la sécheresse. Les stress oxydatifs sont connus pour modifier l'activité des enzymes du système antioxydant parmi lesquelles les SOD, CAT, PER et GR et ainsi réguler la réponse et la résistance aux stress. De nombreux travaux mettent en évidence une augmentation de l'activité des enzymes du système antioxydant en réponse aux stress. Ainsi, des plantes de tomate soumises à la sécheresse montrent une augmentation relative de l'activité des SOD (Perl-Treves et Galun, 1991). En réponse au froid Bruggemann et al., (1999), on observe dans les feuilles de tomate une augmentation de l'activité de la SOD et de l'APX mais une baisse de la GR. Mais, du fait

de la complexité du système, la réponse aux stress en terme d'activité enzymatique ne permet pas de proposer un schéma systématique et reproductible. Ainsi, chez la tomate en situation de stress salin, une baisse de l'activité SOD a pu être mise en évidence, indiquant aussi la possibilité d'une réduction non enzymatique des superoxydes (Mittova et al., 2003). Cette possibilité peut également être envisagée dans notre cas. Par ailleurs, nous n'avons considéré ici qu'une partie du système enzymatique impliqué dans la détoxification des ROS. D'autres enzymes, comme celles du cycle glutathione-ascorbate (DHAR, MDHAR, Fig II-1) jouent également un rôle et leur activité aurait mérité d'être évaluée.

De plus, nous avons mesuré l'activité des enzymes de la fraction soluble des protéines. Les valeurs obtenues sont cohérentes avec les valeurs issues de la littérature portant sur des feuilles de tomate (Mohamed et al., 2003, Shalata et Tal, 1998 ; Gianinetti et al., 1993) mais il faut noter que les enzymes étudiées existent sous plusieurs iso-formes et parfois sous différents types n'ayant pas la même localisation cellulaire. Ainsi, chez les plantes, quatre types de SOD (Cu/Zn SOD, Mn/SOD, FeSOD et NiSOD) sont présents et chacune possède plusieurs formes codées par des gènes différents (Scandalios, 1997), ce qui suggère une régulation complexe. On sait que les feuilles de tomate possèdent des Mn-SOD mitochondriales, un type FeSOD chloroplastique et un type Cu/Zn SOD chloroplastique ou cytosolique (Perl-Treves et Galun, 1991). Les catalases sont essentiellement localisées dans les peroxisomes et les APX sont présentes dans tous les autres compartiments cellulaires (Mittova et al., 2004). Malgré leur taux de réaction catalytiques très élevé, les catalases ont une affinité assez faible avec le H₂O₂ et seraient donc moins efficaces que les APX (Noctor et Foyer, 1998). Chez les plantes supérieures, les peroxidases présentent de très nombreuses isoformes encodées par des familles multigéniques (Yoshida et al., 2003). Chez la tomate, 4 gènes codant pour des peroxidases ont été isolés et caractérisés. La glutathione reductase présente également des localisations multiples : elle serait majoritairement localisée dans les chloroplastes mais aussi dans la mitochondrie et le cytoplasme (Edwards et al., 1990). Elle y est représentée par plusieurs isoformes (Anderson et al., 1995).

Chez *Arabidopsis*, une synthèse portant sur les différents isozymes de la SOD dans des situations de stress oxydatifs très variées (Alscher et al., 2002) montrent qu'il existe des différences importantes de la variation des activités en réponse aux stress et donc des régulations spécifiques en fonction en particulier de la localisation de ces enzymes.

L'absence d'augmentation d'activité enzymatique en réponse aux stress que nous observons pour certaines enzymes mesurées peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas différencié les différents types, en particulier pour la SOD. Une autre possibilité est que dans

notre cas, ces enzymes ne participent pas de façon majeure à la réponse aux stress et que d'autres enzymes ou des processus non enzymatiques puissent participer à l'élimination des ROS.

4.3 – Réponse aux stress des plantes transformées pour *LeEF-Ts_{mt}*

Les plantes entières issues de 2 lignées antisens et deux lignées sens ont été comparées aux témoins sauvages après des traitements de sécheresse, de chaleur et pulvérisation de paraquat. Nous avons parfois obtenu des phénotypes de tolérance au paraquat des plantes AS, mais ces résultats n'ont pas toujours pu être reproduits. Il est possible que l'application par pulvérisation ne soit pas reproductible. D'ailleurs certains auteurs ont procédé en traitant des disques foliaires par flottation (Mohamed et al., 2003), obtenant ainsi une réponse plus homogène. Dans notre cas, nous avons mis en oeuvre un modèle plus simple, les cals de tomate. Sur ce type de matériel, les lignées antisens présentent une meilleure tolérance au paraquat que les WT et les lignées sens. Par ailleurs, ces lignées AS présentent des activités GR et peroxidases supérieures à celles des WT.

L'étude de géotypes plus ou moins résistants aux stress oxydatifs montre une corrélation entre la résistance et des activités accrues des enzymes du système antioxydant. Ainsi *Lycopersicon pennellii*, une espèce de tomate résistante aux sels présente une augmentation des activités de la plupart des enzymes antioxydantes en réponse aux stress salin par rapport à l'espèce cultivée *Lycopersicon esculentum* (Mittova et al., 2003, Mittova et al., 2004). Un mutant de tomate possédant une activité peroxidase plus forte que l'espèce sauvage montre une meilleure résistance au froid évalué par la mesure de la fuite ionique (Gianinetti et al., 1993). L'étude de plantes transgéniques modifiées pour l'expression des gènes codant pour les enzymes du système anti-oxydant montre la plupart du temps la relation directe entre activité de ces enzymes et résistance aux stress (Sen Gupta et al. 1993 ; Polidoros et al., 2001). La surexpression d'une catalase d'origine bactérienne dans les chloroplastes de feuilles de tomate améliore la tolérance au stress photo-oxydatif (Mohamed et al., 2003). Des plantes transgéniques de tomate (Amaya et al., 1999) et de tabac (Yun et al., 2000) surexprimant des gènes de peroxidases montre respectivement une meilleure résistance à la salinité et au paraquat. Une plus faible activité GR chez des plantes de tabac transformées en antisens a pour conséquence une augmentation de la sensibilité au paraquat (Aono et al., 1995). Par contre, la surexpression d'une GR d'E.coli chez la tomate n'améliore pas la

résistance au froid (Brüggemann et al., 1999) suggérant que l'activité de cette n'est pas le facteur limitant.

En résumé, on peut globalement relier l'activité des enzymes du système antioxydant à la capacité de plantes à tolérer différents types de stress débouchant sur un stress oxydatif. Nos résultats suggèrent que l'activité accrue de la GR et des peroxidases chez les lignées antisens leur confèrent une meilleure tolérance aux stress.

En conclusion, le mécanisme précis qui permet d'expliquer que des plantes sous-exprimant le gène *LeEF-Ts_{mt}* présentent certaines activités enzymatiques impliquées dans les stress oxydatifs plus élevées reste à élucider. On peut envisager que l'altération de la synthèse des protéines mitochondriales conduit à un dysfonctionnement de la réduction de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire, entraînant une augmentation des ROS. Cette production accrue de ROS pourrait être à l'origine de l'induction des enzymes du système antioxydant, aussi bien dans des conditions normales que dans des conditions de stress oxydatifs. Ces activités plus fortes permettraient aux lignées AS d'être plus tolérantes aux stress oxydatifs. Une analyse plus détaillée des différentes composantes du système serait nécessaire pour conclure.

CHAPITRE III

EFFETS DE LA SOUS ET SUR EXPRESSION DE *LeEF-TS_{mt}* SUR LE PROTEOME MITOCHONDRIAL DE CALS DE TOMATES

1. INTRODUCTION

Les mitochondries assurent un grand nombre de fonctions biochimiques dans les cellules d'eucaryotes. Leur rôle principal réside dans l'oxydation des acides organiques du cycle tricarboxylique et la synthèse d'ATP couplée au transfert d'électrons du NADP⁺ réduit à l'oxygène via la chaîne de transport d'électrons. Cependant, les mitochondries ont également d'autres fonctions importantes telles que la synthèse de nucléotides, d'acides aminés, de lipides et de vitamines (Unsel et al., 1997). On estime que les mitochondries de plantes possèdent 2000 à 3000 protéines (Millar et al., 2005, Trends), la majorité d'entr'elles étant codées par le noyau et importées dans la mitochondrie. Cependant les mitochondries possèdent leur propre génome (Gray et al., 1999) et sont capables de réaliser la transcription et la traduction de protéines intrinsèques qu'on estime au nombre de 300 environ (Brennicke et al., 1999). Dans ce schéma, la protéine *LeEF-TS_{mt}*, codée par le génome nucléaire a une place particulière puisqu'elle est ciblée vers la mitochondrie et intervient dans les processus de traduction des protéines codées par le génome mitochondrial (Benichou et al., 2003).

Afin de connaître le rôle précis de la protéine *LeEF-TS_{mt}* dans la synthèse des protéines mitochondriales nous avons mis en oeuvre une approche de protéomique pour comparer le protéome mitochondrial de matériel végétal sur ou sous-exprimant le gène *LeEF-TS_{mt}*. La comparaison des protéomes a été abordée à l'aide d'une technique de double marquage ¹⁴N/¹⁵N appliquée à des tissus de tomates cultivés *in vitro*. De plus, l'analyse protéomique en tant que telle permettra d'obtenir des données nouvelles sur les protéines mitochondriales de tomate.

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1- Cultures de cals

Les cultures de cals sont établies à partir d'explants de tige de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Micro-Tom) transformées (AS 77/11 et S 8/22) et sauvage (WT), âgées de 15 jours et cultivées *in vitro* sur un milieu de culture MS/2 (Murashige & Skoog, 1962). La caulogénèse est initiée par la mise en culture d'explants de 1 cm de longueur, dans des boîtes de Pétri (5 cm de diamètre) sur un milieu MS normal additionné de 2,4-D (1 mg/L), de BAP (0,2 mg/L), de vitamine de Morel (1950) (1 mL/L), de saccharose (20 g/L) et d'agar (8 g/L). Les cals obtenus sont repiqués tous les 20 jours sur le même milieu neuf et cultivés à 25°C, sous un éclairage de 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, une photopériode de 16 h jours et 8 h nuit et une hygrométrie relative de 70%.

2.2 - Marquage isotopique différentiel des protéines

Afin de réaliser le marquage isotopique différentiel des protéines, les cals sont cultivés pendant 3 cycles de culture sur le milieu décrit ci-dessus, soit en présence de $^{14}\text{NH}_4^{14}\text{NO}_3$ et de K^{14}NO_3 , soit en présence de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ et K^{15}NO_3 (Cortec).

2.3 - Isolement et purification des mitochondries

Les mitochondries ont été isolées selon la méthode décrite par Holtzapffel *et al.* (1998) et Millar *et al.* (2001) que nous avons adaptée à notre matériel végétal. Toutes les étapes suivantes ont été exécutées à 4°C. L'extraction des mitochondries est réalisée à partir de 16 g des cals âgés de 20 jours, provenant de 8 g des cals cultivés en présence de ^{14}N et 8 g de cals cultivés en présence de ^{15}N . Ce mélange est placé dans un tube à centrifuger de 50 mL et additionné de 16 ml de tampon extraction (0,3 M mannitol, 50 mM pyrophosphate du sodium, 25 mM TES [pH 8,0], 0,5% [v/v] albumine sérum bovine [BSA], 0,5% [v/v] polyvinylpyrrolidone PVP-40, 2 mM EDTA, 20 mM ascorbate). Le broyage des tissus est réalisé à l'aide d'un homogénéiseur Polytron (Kinematica GMBH, Luzern, Schweiz) à raison de 15 impulsions de 1 s. L'homogénat est filtré sur une toile de 40 μm . Les débris cellulaires restant sur la toile sont repris de nouveau dans 16 ml de tampon d'extraction et sont soumis à nouveau broyage et filtration. Les 2 filtrats sont réunis et sont centrifugés à 1.000 g pendant 5 min (Sorvall RC5C, Rotor SS-34). Le surnageant obtenu est de nouveau centrifugé à 18.000 g pendant 15 min et le culot contenant les mitochondries est remis en suspension avec 30 mL de

tampon d'extraction. Cette suspension est centrifugée 10 min. à 1.000 g et le surnageant récupéré est de nouveau centrifugé 15 min à 18 000 g. Le culot de cette dernière centrifugation est re-suspendu dans 2 mL de tampon de lavage pH 7,5 (0,3M mannitol, 10 mM TES, 0,1% [w/v] albumine sérum bovine [BSA]) et déposé délicatement sur un gradient discontinu de Percoll 1:4:2 (5 mL 55% Percoll - 20 mL 23% Percoll - 10 mL 18% Percoll - Amersham Biosciences). Ce gradient est préparé avec le tampon de lavage doublement concentré. Après centrifugation à 40 000 g pendant 45 min, le contenu du tube est fractionné en aliquotes de 2 mL. Le repérage des fractions contenant les mitochondries est effectué par la mesure de l'activité cytochrome C oxydase. Les fractions contenant les mitochondries sont rassemblées (environ 8 mL) et déposées dans un tube à centrifuger de 50 mL contenant 20 mL d'un gradient autogénéré de Percoll à 28%, préparé dans un tampon suivant : 0,6 M saccharose, 2 mM EDTA, 20 mM TES; pH 7,5. Après centrifugation 30 min à 40 000 g, le contenu du tube est fractionné en aliquotes de 2 mL. Dans chaque fraction ont effectuées les analyses enzymatiques permettant de révéler les fractions enrichies en mitochondries et le degré de contamination par des protéines extramitochondriales. Les fractions ayant le plus haut niveau d'activité cytochrome C oxydase sont rassemblées et diluées 1:10 avec tampon de lavage pH 7,5 (0,3M mannitol, 10mM TES, 2mM EDTA). Après centrifugation 30 min à 15 000 g, le culot contenant les mitochondries pures est repris par 2 mL de tampon de lavage et centrifugé dans un tube conique 5 min à 15 000 g (centrifugeuse Eppendorf 5415R). Le culot final est repris dans du tampon de lavage (volume final de 200 µL) et conservé à -20°C jusqu'à usage. L'ensemble de ces opérations est résumée dans la figure III-1.

La concentration de protéine dans les échantillons est déterminée par la méthode de Bradford (1976).

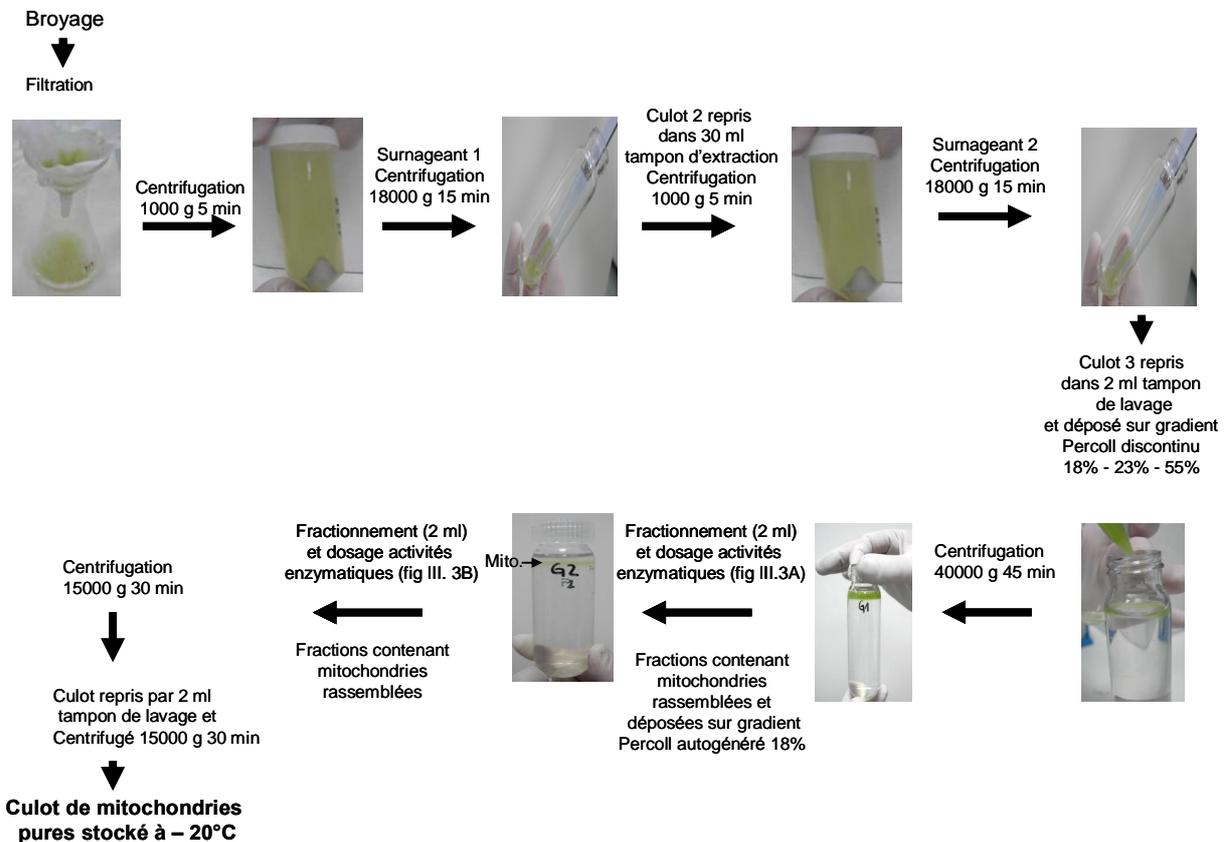


Figure III-1. Récapitulatif des opérations effectuée pour l'obtention de mitochondries pures de cals de tomate.

2.4 - Mesure de l'activité Cytochrome C Oxydase (CcO - EC 1.9.3.1)

La méthode utilisée a été rapportée par Chervin & Thibaud (1992) et Chen *et al.* (2004). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation du cytochrome C réduit par la cytochrome C oxydase. Préalablement au dosage de l'activité enzymatique, il nécessaire de préparer le cytochrome C réduit, substrat de l'enzyme. Pour cela, on prépare 50 ml d'une solution 80 μ M de cytochrome C oxydé dans un tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 7,0) additionné de 0,4% de triton X-100 et on réduit le cytochrome C par pour l'addition progressive de 5 μ L de solution 0,14 M de ditionite de sodium jusqu'à avoir une absorbance stable à 550 nm environ égale à 2 ($Abs_{550}=2$), mesuré avec spectrophotomètre Uvikon 930. L'excès de ditionite de sodium est supprime pour la addition de cytochrome C oxydé jusqu'à une diminution sensible de l'absorbance ($\sim Abs_{550}=1,8$). La mesure de l'activité cytochrome C oxydase est initiée par l'addition de 50 μ L d'échantillon protéique et la cinétique d'oxydation est mesurée à 550 nm pendant 2 min.

Calcul de la activité enzymatique :

$$\text{Activité} = [(d \text{ Abs}_{550}/\text{min}) / (\epsilon_{\text{red } 550} - \epsilon_{\text{ox } 550}) \times VT] / (C \times VM)$$

d Abs₅₅₀/min: différence d'absorbance par minute (d Abs₅₅₀/min)

$\epsilon_{\text{ox } 550}$: Coefficient d'extinction du cytochrome C oxyde : $29,5 \times \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$\epsilon_{\text{red } 550}$: Coefficient d'extinction du cytochrome C réduit : $9,5 \times \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

VT: Volume total de la réaction (mL)

C: Concentration de la protéine dans l'échantillon (mg/mL)

VM: Volume d'échantillon (mL)

l: longueur cuvette en cm

2.5 - Détermination de la pureté des mitochondries

Afin de vérifier la présence de contaminations provenant des autres compartiments de la cellule, l'activité des marqueurs enzymatiques suivants ont été mesurés dans chaque fraction (2 mL): l'alcool dehydrogenase pour le cytosol (Tesnière & Verriès, 2000; Bozcuk *et al.* 2004), la catalase pour les peroxisomes (Beers & Sizer, 1952), et l'alkaline pyrophosphatase pour les chloroplastes (Hemalatha & Prasad, 2002; Bailey, 1965).

2.5.1- Alcool deshydrogenase (ADH - EC 1.1.1.1) : La méthode utilisée est celle décrite par Tesnière & Verriès (2000) et Bozcuk *et al.* (2004). Le principe de cette méthode consiste à mesurer la réduction de l'acetaldehyde par le NADH. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée un volume de 1 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 5,8) contenant 0,24 mM NADH et 5 mM acetaldehyde. La réaction est initiée par l'addition de 50 μL d'extrait enzymatique et mesurée pendant 3 min à 340 nm avec spectrophotomètre Uvikon 930.

Calcul de la activité enzymatique :

$$\text{Activité} = \mu\text{moles NADPH}/\text{min}/\text{mg protéines} = [(d\text{Abs}_{340}/\text{min})/\epsilon \times VT]/(C \times VM)$$

d Abs₃₄₀/min: différence d'absorbance par minute (d Abs₃₄₀/min)

ϵ : Coefficient d'extinction du NADPH ($6,22 \text{mM} \times 1 \text{cm}^{-1}$)

VT: Volume total de la réaction (ml)

C: Concentration de la protéine dans l'échantillon (mg/ml)

VM: Volume d'échantillon (ml)

l: longueur cuvette en cm

2.5.2 - Alcaline Pyrophosphatase (alkPP - EC 3.6.1.1): La méthode utilisée est celle rapportée par Hemalatha & Prasad (2000). Le principe de la méthode est basée que l'alcaline pyrophosphatase en présence de Mg^{+} catalyse la réaction $P_2O_7^{4-} + H_2O = 2HPO_4^{2-}$. Le orthophosphate qui reste, est déterminé par colorimétrie avec le méthode de Fiske & Subbarow (1925). La réaction est réalisée dans un volume de 2 mL contenant 2,5 mM de pyrophosphate de sodium, 5 mM $MgCl_2$ et 0,05 M de tampon Tris-HCl (pH 8,6). Ce mélange est incubé 5 min à 37°C, puis additionné de 50 μ L d'extractif enzymatique mitochondrial et de nouveau incubé 10 min à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 1 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. Dans une tube de verre de 10 mL, 504 μ L du mélange réactionnel précédent sont mélangés avec 500 μ L de molybdate d'ammonium $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}, 4H_2O]$ à 0,02 M et 400 μ L de sulfate ferrique ($FeSO_4, 7H_2O$) à 0,36 M préparé dans une solution d'acide sulfurique 0,02 M. Le volume final de 5 mL a été ajusté avec l'eau. Parallèlement, une courbe étalon comprise entre 0 et 200 μ g de PO_4^{3-}/mL à partir d'une solution de KH_2PO_4 est réalisée selon le protocole de Bailey (1965). Pour réaliser la courbe étalon, les réactions sont effectuées à température ambiante pendant 30 min. Le phosphate inorganique se complexe avec le molybdate pour donner une coloration jaune mesurée par spectrophotométrie à 600 nm. La quantité de phosphate est calculée à partir l'équation de la courbe étalon $y = ax + b$ où μ gP/min. = $(Abs_{600} - b)/a$.

Calcul de la activité enzymatique (μ mol Pi g protéine⁻¹ min⁻¹) :

Activité = $(\mu$ gP x 0.0322)/10 (VM C)

0.0322: conversion μ g en μ mol (0,0322 μ mol PO_4^{3-}/μ g KH_2PO_4)

10: Temps de réaction (min)

C: Concentration de protéine dans échantillon (mg/mL)

VM: Volume d'échantillon (mL)

2.5.3 – Catalase : La méthode est décrite dans le chapitre II

2.6 - Électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS/PAGE)

Environ 40 µg de protéines ont été solubilisées à partir des mitochondries issues des cals des lignées Sens, Antisens et Sauvage dans 115 µL du tampon de dénaturation (Tris 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2%, glycérol 10%, β-mercaptoéthanol 5%, DTT 10 mM contenant une goutte de Bleu de bromophénol). La solubilisation s'effectue durant la nuit à température ambiante (20°C). Les protéines sont ensuite dénaturées à 100°C pendant 5 minutes. Pour la séparation, un gel (dimensions : 14 cm de large, 16 cm de hauteur et 1,5 mm d'épaisseur) de polyacrylamide a été utilisé (4% en acrylamide pour le gel de concentration et 12% pour le gel de séparation). L'électrophorèse est réalisée sous une intensité de 30mA pendant 15 minutes durant la concentration des protéines, puis à 20-25mA dans le gel de séparation pendant 5 à 6 hs. Des marqueurs de poids moléculaire (10 µL, Sigma) sont déposés sur une piste voisine des échantillons protéiques mitochondriaux.

En fin de migration, les gels sont brièvement rincés dans de l'eau milliQ (2-3 minutes) avant d'être fixés. La fixation est réalisée sous agitation lente toute la nuit dans un mélange eau milliQ/éthanol/acide acétique (50/40/10) en vue d'une coloration au Bleu de Coomassie R250 ou dans une solution de méthanol 50% pour une coloration au Bleu Colloidal G250.

2.7 - Coloration et décoloration des gels.

Les gels sont colorés pendant une heure avec le Bleu de Coomassie R250 à raison de 0,025-0,05% dans le mélange fixateur décrit ci-dessus. La coloration au Bleu Colloidal G250 nécessite une étape de sensibilisation dans le mélange méthanol/acide phosphorique/ammonium sulfate (34/2/17) pendant 1 heure. Le gel est ensuite coloré dans la solution précédente contenant le colorant G250 à raison de 0.66g/l sous agitation lente durant une nuit à température ambiante. Après coloration, l'excès de Bleu de Coomassie R250 est éliminé sous agitation lente à 4°C dans le mélange éthanol, eau et acide acétique (25/67/8). Plusieurs rinçages sont nécessaires pour que les protéines apparaissent sur un fond transparent. Le Bleu Colloidal G250 en excès est éliminé par l'eau et après quelques heures de rinçage les protéines colorées apparaissent sur le fond transparent. Les gels sont conservés à 4°C dans une solution contenant 1 à 2% d'acide acétique.

2.8 - Analyse d'image

L'image des gels est numérisée à l'aide d'un scanner en lumière visible (Imagescanner, Amersham). L'image numérisée est quantifiée avec le logiciel ImageQuant-TL.

2.9 - Excision et lavage des zones de gel

Les zones d'intérêt qui ont été repérées sur le gel, sont soigneusement découpées à l'aide d'un scalpel et les morceaux sont placés dans des tubes eppendorfs en polypropylène de 0,5 mL (TREFF). Ils sont lavés à l'eau ultrapure milliQ puis 2 fois avec 100 µL d'une solution de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) 25mM/acétonitrile (50%/50%). Après élimination des surnageants, les morceaux de gels sont séchés au speed Vac à 45°C.

2.10 - Digestion trypsique, extraction des peptides et préparation des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Les morceaux de gels sont réhydratés avec 20 µL d'une solution de trypsine (Promega) à 10 ng/µL dans le tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM, pH 8. Ils sont placés dans un four à micro-ondes (300 W) pour 5 min après addition de 10 µL de bicarbonate 25 mM, la digestion protéolytique s'effectue à 37°C pour la nuit.

Avant l'analyse en spectrométrie de masse, les peptides libérés par l'action de la trypsine doivent être extraits selon les protocoles suivants :

A - Pour l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF, 40 µL de la solution $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (10/62,5/27,5 v/v) sont ajoutés dans chaque échantillon. Ils sont agités au vortex pendant 5 min, soumis à sonication pendant 5 min puis incubés 10 min. à 38°C. Après addition de 25 µL d'acétonitrile pur, ils sont traités selon les mêmes étapes décrites au paragraphe précédent. Le surnageant d'extraction est récupéré et évaporé à sec au speedvac pour 45 min. Le résidu est repris par 4µL d'une solution $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50) contenant de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1%. Une aliquote (environ 1µl) de la solution peptidique obtenue est déposée sur la plaque MALDI et mélangée avec 1 µL de matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid , 6 mg/ml dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (70/30/0.1).

Pour certains échantillons dont les signaux en spectrométrie de masse MALDI-TOF sont faibles, il est nécessaire d'effectuer un dessalage. Ceci s'effectue sur des micro-suppports de phase reverse du type C_{18} (C_{18} Zip-Tip™). Après équilibration du micro-support dans une solution de TFA à 0.1%, l'échantillon peptidique dilué dans 10µls de TFA à 0.1% est filtré à

travers le support sur lequel se fixent les peptides ; Après un lavage par 10µls de TFA à 0.1%, les peptides sont élués dans 2 µls de solution CH₃CN/H₂O/TFA (70/30/0.1%) directement sur la plaque du spectromètre MALDI. Après évaporation partielle du solvant, l'échantillon est recouvert par 1µl de solution de matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid).

B - Pour l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), les peptides sont extraits de la même manière que pour l'analyse par MALDI-TOF. Après évaporation du surnageant d'extraction, le résidu est repris dans 12µls du solvant CH₃CN/H₂O/HCOOH (2/98/0.1). Dans ce cas, l'acide formique (HCOOH) remplace l'acide trifluoroacétique (TFA) qui provoque des phénomènes de suppression ionique lors de l'ionisation en source electrospray. Cinq µl de la solution peptidique sont ensuite utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS.

2.11 - Analyses par spectrométrie de masse

Les analyses des protéines ont été effectuées sur la plate-forme protéomique de l'IFR40 de Toulouse. Les appareils utilisées sont un spectromètre de masse du type MALDI-TOF (VoyagerDE STR, Applied Biosystems, USA) et un système de couplage composé d'une HPLC à nano-débit (DIONEX) et d'un spectromètre de masse de géométrie hybride comprenant un triple quadripole et une trappe lineaire (Q-TRAP, Applied Biosystems USA) muni d'une source nano-electrospray.

2.12 - Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Cette technique consiste à comparer la liste des masses des peptides obtenues expérimentalement à celles contenues dans les bases de données qui ont été déduites des séquences génomiques. L'efficacité de cette méthode est donc dépendante du séquençage du génome de l'espèce étudiée.

L'acquisition des spectres se fait en mode positif en utilisant le mode réflectron. L'accélération est de 20 kV, le délai de 200 ns et la tension de grille de 68%. L'acquisition des masses est réalisée entre 750 et 3000 Da. Les spectres sont calibrés de façon interne avec les produits d'autolyse de la trypsine (ions monoisotopiques MH⁺ : 842.51 et 2211.10).

L'identification des protéines est réalisée en utilisant l'outil MS-FIT du progiciel Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>). Les recherches ont été effectuées

sur la base de données protéiques non redondantes du National Centre for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Une seule omission de coupure par peptide a été autorisée et la tolérance de masse est de 20 ppm.

2.13 - Identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem LC/MS/MS.

Brièvement, les peptides issus de la digestion trypsique sont injectés (LC Packings Famos autosampler) et concentrés sur une μ -Precolumn™ Cartridge (PepMap™, LC Packings) C18, 5 μ m, 100Å dans le tampon A (2% d'acétonitrile et 0,1% acide formique dans l'eau). Les peptides sont ensuite séparés sur une colonne 75 μ m ID X 150 mm C18 3 μ m (PepMap™, LC Packings) par un gradient linéaire de 0 à 60% de tampon B (90% acétonitrile et 0,1% acide formique dans l'eau) durant 30 min. Le débit est de 200 nL/min avec l'utilisation d'une pompe LC Packings Ultimate™ LC. Au cours de leur élution, les peptides sont infusés en continu dans la source du spectromètre.

L'acquisition sur le spectromètre est effectuée par une succession de cycles durant environ 4 secondes. Chaque cycle comporte une première phase consistant en un balayage pour évaluer les masses des peptides, dans une deuxième phase l'état de charge de chaque peptide est évalué par un balayage sélectif et à haute résolution sur les ions détectés dans la première phase et finalement les ions présentant un état de charge égal à 2 ou 3 sont fragmentés pendant 2 phases successives.

Les données collectées pendant cette analyse sont compilées par le logiciel Analyst (AppliedBiosystems/MDS Sciex, USA) et soumises au logiciel Mascot (Matrix Science, London, UK) pour réaliser la recherche dans les bases de données. Les recherches sont réalisées avec une tolérance de la mesure de la masse de 0,5 Da en mode MS et 0,3 Da en mode MS/MS. L'identification des protéines est accomplie par blast sur la banque protéique viridiplantae de NCBI.

2.14 - Quantification relative des protéines par spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS après marquage métabolique à l'azote ¹⁵N.

La culture d'un organisme sur un milieu fortement enrichi en azote ¹⁵N permet de marquer uniformément les protéines produites par cet organisme. Ainsi, chaque peptide issu de la digestion trypsique de la séquence protéique voit sa masse augmentée d'une unité (Dalton) par atome d'azote présent dans la séquence.

A titre d'exemple, la séquence d'acides aminés suivante, C-E-S-A-R, a une composition élémentaire de C23 H42 N9 O10 S1 et une masse de **636.2775** en azote ^{14}N et de $636.2775 + 9 = \mathbf{645.2775}$ en azote ^{15}N . Ainsi, lors de l'analyse des masses (mode MS) en spectrométrie de masse par couplage LC-MS/MS, chaque peptide infusé apparaîtra sous la forme d'un signal double, l'un correspondant à l'isotope ^{14}N et l'autre à l'isotope ^{15}N . Ces 2 signaux seront strictement simultanés. Le rapport des intensités totales de ces 2 signaux sera représentatif de l'abondance relative du peptide et donc de la protéine dont il est issu si ce peptide n'est présent que dans cette protéine. Pour une même protéine, si plusieurs peptides sont identifiés, on disposera donc de plusieurs rapports qui seront identiques pour tous les peptides présents uniquement dans cette protéine. Pour chaque peptide identifié, l'intégration des surfaces totales des signaux en mode MS est réalisée avec l'aide du logiciel Analyst (Applied Biosystems), le rapport des intensités est calculé et reporté dans le tableau de résultats. L'ensemble de ces opérations sont illustrées dans la figure III-2.

2.15 – Séquençage du proteome total mitochondrial

La totalité de la piste monodimensionnelle du gel d'électrophorèse (figure III- 4A piste WT) a été découpée en 47 spots et chacun des spots après digestion et extraction des peptides a été analysé comme précédemment en mode fragmentation (LC/MS/MS). Pour la séquençage, un banque blast généré à partir des séquences fasta de protéines prédites à partir des unigens de la tomate (<http://www.sgn.cornell.edu/>) a été utilisée.

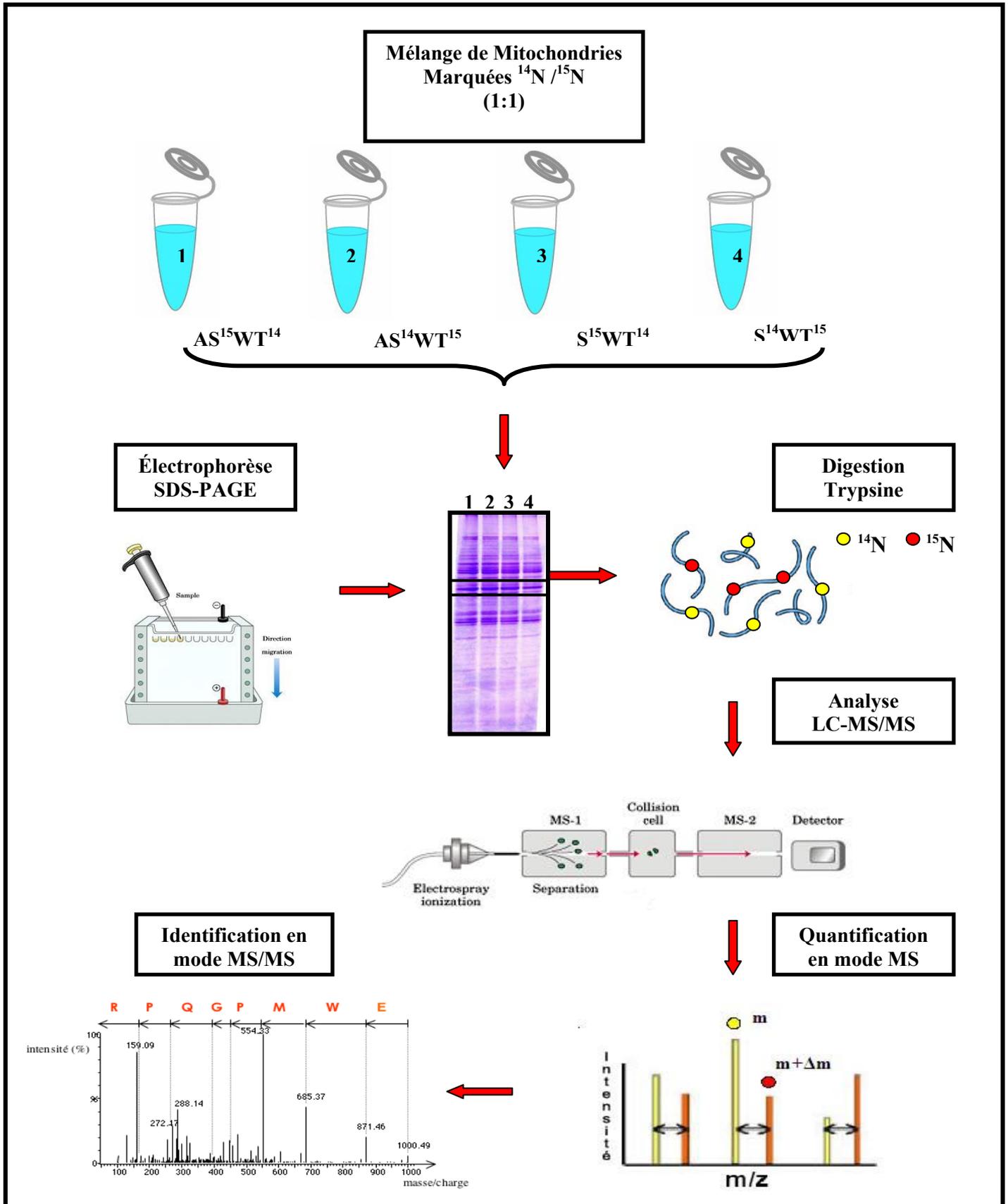


Figure III-2. Résumé des opérations mises en œuvre pour la quantification relative des protéines par spectrométrie de masse après marquage à l'azote ^{15}N .

3 - RESULTATS

3.1 – Purification des mitochondries

L'étude des marqueurs enzymatiques dans les différentes fractions obtenues après séparation de l'extrait de cals de tomates sur le gradient discontinu de Percoll fait apparaître 2 pics d'activité cytochrome C oxydase, marqueur des mitochondries ; un premier pic étalé entre les fractions 2-7 et un second pic resserré dans les fractions 14-17. L'activité alcaline pyrophosphatase, marqueur des chloroplastes, est présente dans toutes les fractions avec un maximum observé dans le pic 2 contenant les mitochondries. Les autres activités, catalase (peroxisomes) et ADH (cytosol), sont très faibles dans toutes fractions (fig. III-3A). Seules les fractions 14-17 (8 ml) ont été retenues pour effectuer la suite de la purification sur un gradient autogénéré de Percoll à 28 %. Les analyses des marqueurs enzymatiques montrent que seules les trois premières fraction du gradient (1-3) contiennent les mitochondrie et ces fractions sont très faiblement contaminées par les enzymes des autres compartiments, moins de 0,03% des activités initiales (fig. III-2B).

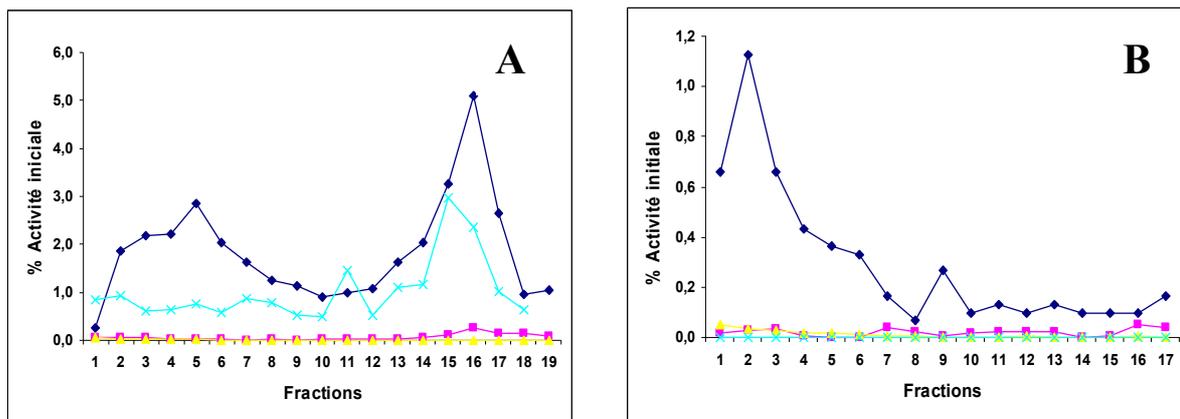


Figure III.3. Isolation et purification de mitochondries de cals de tomate par centrifugation sur gradient de densité de Percoll. A. Fractionnement sur un gradient discontinu de Percoll [55% (fractions 17-19), 23% (fractions 6-17) et 18% (fractions 1-6)]. B. Fractionnement sur un gradient autogénéré de Percoll 28% des fractions 14-16 de la première séparation.. Activités : cytochrome C oxydase (◇), catalase (□), alcaline pyrophosphatase (x) et alcool deshydrogenase (Δ) dosées dans chaque fraction. Les valeurs sont exprimées en % des activités totales présentes dans le surnageant de la première centrifugation.

3.2 – Effet de la transgénèse sur les modification des profils protéiques

3.2.1 - Etude des profils de séparation par SDS-PAGE de protéines de mitochondries issues de cals WT, AS et S colorées au bleu de Coomassie R250.

La coloration au bleu de Coomassie R250 ne permet pas une quantification des protéines mais autorise à une estimation visuelle. Cette analyse visuelle du gel montre que la sous-expression ou la sur-expression de *LeEF-Ts_{mt}* ne provoque pas d'importantes variations entre les 3 profils protéiques, excepté l'apparition d'une bande nettement plus importante dans la piste "S" au niveau de 40 kD (Fig. III-4). L'analyse par MALDI-TOF de cette zone a permis d'identifier des peptides appartenant à la protéine *LeEF-Ts_{mt}* (tableau III-1).

Tableau III.1: Résultats de l'analyse MALDI-TOF des peptides contenus dans la bande "*LeEF-Ts_{mt}*" observée dans la piste "S" de la figure III-4A.

Acc. #:Species: LYCOPERSICON ESCULENTUM Name: ethylene-responsive elongation factor EF-Ts precursor Index: MW: 42767 Da pI: 8.8								
m/z Submitted	MH ⁺ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence	
1286.7233	1286.7208	2.0		248	259	0	(R)	(N)
1456.8015	1456.7760	18		122	135	0	(R)	(K)
1509.8507	1509.8317	13		152	164	0	(R)	(L)
1616.8534	1616.8284	15		91	105	0	(K)	(D)
2611.4045	2611.4136	-3.5		165	188	0	(K)	(L)
2630.3201	2630.3401	-7.6		222	247	0	(R)	(I)
2646.3105	2646.3350	-9.2	1Met-ox	222	247	0	(R)GFAMSAPSLGVISTYLHTSPQPGVGR(I)	

3.2.2 - Etude des profils de séparation par SDS-PAGE de protéines de mitochondries issues de cals WT, AS et S colorées au bleu colloidal G250.

L'analyse visuelle du gel d'électrophorèse coloré au bleu colloidal (Fig. III-4B) ne permet pas d'observer des différences entre les profils de protéines WT, AS et S. Par contre, après numérisation du gel à l'aide d'un scanner en lumière visible et quantification de l'image numérisée avec le logiciel ImageQuant-TL, il est possible de repérer un dizaine de zones dans lesquelles les bandes de protéines "AS" semblent moins abondantes ou identiques à celles des protéines "WT" et où les bandes de protéines "S" paraissent plus abondantes que dans les bandes "WT" (Fig. III. 4).

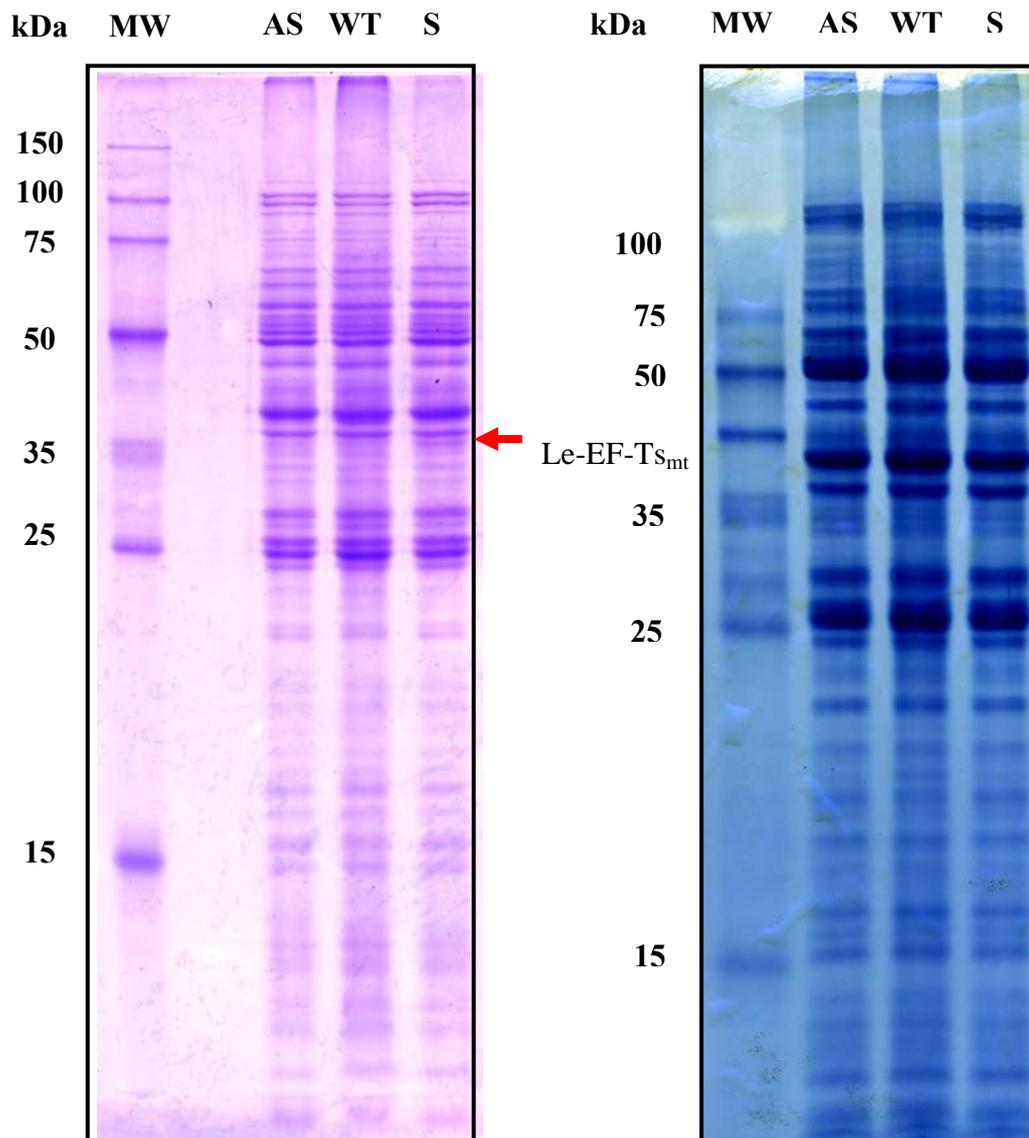


Figure III. 4. Séparation des protéines issues de mitochondries de cals AS, WT et S par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie R250 (A) ou au bleu colloïdal (B). La flèche rouge

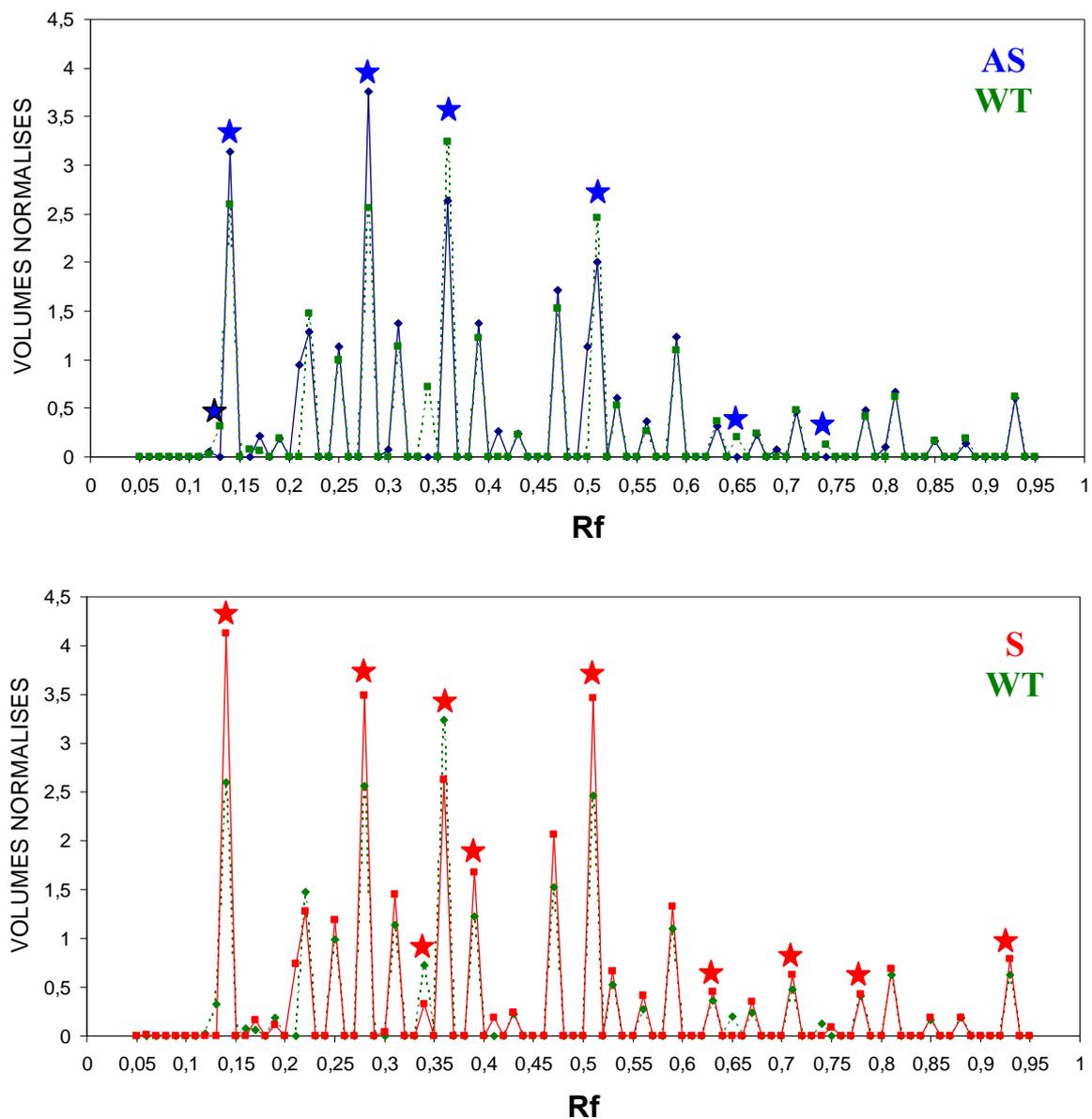


Figure III-5 . Comparaison des profils protéiques de mitochondries AS vs WT (A) et S vs WT (B) obtenus par analyse d'image de gels SDS-PAGE. Les étoiles bleues et rouges indiquent les bandes protéiques susceptibles d'être affectées par la sous- ou sur-expression de LeEF-Ts_{mt} respectivement

3.2.3 - Quantification relative des protéines par spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS après marquage métabolique à l'azote ^{15}N .

Les proportions relatives des protéines contenues dans les différentes zones repérées en analyse d'images peuvent être déterminées, d'une part grâce au marquage métabolique par l'azote ^{14}N et ^{15}N des cals et par ailleurs grâce à la digestion trypsique du contenu de chaque zone suivie de l'extraction des peptides libérés qui fournit un échantillon analysable par chromatographie liquide (LC) et spectrométrie de masse (MS ou MS/MS) associées en tandem.

L'étude simultanée de l'ensemble des protéines contenues dans une zone de gel est désignée par le terme anglo-saxon de « shotgun » et l'approche consistant à identifier les protéines à partir des peptides libérés par digestion enzymatique est appelée « bottom-up ». Pour chaque peptide dont la fragmentation (mode MS/MS du spectromètre) a permis l'identification de la séquence et ainsi son attribution à une protéine, le spectromètre de masse a aussi fourni la proportion relative du peptide portant l'isotope ^{14}N et de celui portant l'isotope ^{15}N . Nous avons pu ainsi identifier à partir du séquençage de 98 peptides dont la fragmentation individuelle a été validée par le logiciel "MASCOT", 43 protéines dont l'origine mitochondriale est confirmée par leur annotation sur la banque "UniProtKB". L'ensemble de ces résultats, identification des protéines et valeur d'intensité relative $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, est reporté dans le tableau III-2.

Pour résumer les données quantitatives, les valeurs des rapports correspondant à chaque peptide ont été rapportées sur les graphes de la Figure III-6. Les graphes correspondant aux rapports $\text{AS}^{15}/\text{WT}^{14}$ et $\text{AS}^{15}/\text{WT}^{14}$ (Fig III-6A et Fig III-6B) indiquent qu'aucun des peptides identifiés, y compris les peptides issus de LeEF-Ts_{mt}, ne présente aucune variation significative de sa teneur à l'exception de la protéine de choc thermique spécifique de la mitochondrie MT-HSP28.3 pour laquelle 2 peptides ont été trouvés plus de 2 fois moins représentés dans l'échantillon AS que dans l'échantillon WT. Par contre, l'examen des graphes représentant les rapports $\text{S}^{15}/\text{WT}^{14}$ et $\text{S}^{14}/\text{WT}^{15}$ (Fig. III-6C et Fig. III-6D) font apparaître 3 protéines sur-représentées dans l'échantillon "sens":

- la protéine LeEF-Ts_{mt} (AF096247) dont le rapport mesuré sur 4 peptides indique une quantité 4 à 7 fois supérieure dans les mitochondries des cellules transformées.

- la protéine MT-HSP23.8 (BAA32547) dont la quantité est également multipliée par un facteur 5 dans les mitochondries « sens ».

Tableau III. 2 : Liste des séquences peptidiques obtenues par MS/MS, identification des protéines pour chacune des zones repérées par analyse d'image et quantification relative des protéines grâce au marquage à l'azote ¹⁵N

Spot	Peptide	Description	AS ¹⁵ /WT ¹⁴	AS ¹⁴ /WT ¹⁵	S ¹⁵ /WT ¹⁴	S ¹⁴ /WT ¹⁵
1	K.VQEVSEIFGK.S R.IINEPTAAALSYGMNSK.E K.GVNPDEFAVAMGAAALQGGILR.G	dnaK-type molecular chaperone HSP68, mitochondrial - potato	1,098 0,841 1,088	1,829 2,646 2,105	1,33 1,061 1,26	1,392 0,72 0,873
2	K.EAIEEDLAEGYR.E R.QGLSEGATLAEVVR.E K.IVVAGAGSAGIGVNLNAR.K	malate dehydrogenase (decarboxylating) (EC 1.1.1.39) 62K chain precursor, mitochondrial - potato	0,743 0,857 0,749	1,296 1,512 1,48	1,033 1,38	1 0,898 0,709
2	R.AFGGQSLDFGK.G R.LGANSLLDIVVFR.A K.AVIELNYGLPFSR.T	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) flavoprotein alpha chain [imported] - Arabidopsis thaliana	0,987 0,83 0,956	1,855 2,185 2,051	1,146 1,782	1,181 0,984 1,26
3	R.VLNTGSPITVPVGR.A R.VGLTGLTVAEHR.D R.VLNTGSPITVPVGR.A K.TVLIMELINNAK.A R.FDEGLPPLTALVLDNQIR.L R.VLNTGSPITVPVGR.A	ATPase beta subunit - Nicotiana sylvestris (Wood tobacco). H+-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) beta-1 chain, mitochondrial - curled-leaved tobacco	1,058	1,729 2,082 2,15 1,78		0,584 0,9
3	R.FDEGLPPLTALVLDNQIR.L K.GEDFPAENYIVK.D K.NLQLLLTAGIGSDHVDLKA K.AAAAAGLTVAEVTGSNTVSAEDEL.M K.QGLEALKPELLSSIEK.G	Formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2) - Lycopersicon esculentum (Tomato). Mitochondrial malate dehydrogenase - Lycopersicon esculentum (Tomato).	1,337 1,008 1,54	0,992 1,718 2,7432		0,835
3	K.VAVLGAAGGIGOPILLSMK.L K.LNPLVSSLSLYDIAGTPGVAADVSHIN R.SEVAGFACEEQLGQALEGADVVIIPA K.IGVSMLEVFK.Q K.KGGTEHLGLPVFNTVEEAK.A K.FIADPOTEGIVLGEIGGTAEEDAAALI K.YFEEVWLVEQK.F R.NEIFOYLALSLAK.L K.AALVTSNWDIEAAQK.D K.SVQNAITEVAAMMGENVK.L K.LALLLEGSQQSFAAFPIGHLEELK.L R.GFAMISAPSLGVISTYHLTSPQPGVG K.FGISAEVINL.R.S	Succinyl-CoA ligase alpha subunit (EC 6.2.1.5) - Lycopersicon esculentum (Tomato). Ethylene-responsive elongation factor EF-Ts precursor - Lycopersicon esculentum (Tomato). Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit isoform 3 (EC 1.2.4.1) - Zea mays (Maize).	0,751 0,623 0,71 1,034	1,922 2,526 1,285 1,452 1,896 1,209	1,016 0,798 1,041 1,141 5,347 4,026 4,486 4,865	0,88 1,598 5,226 7,345
3	R.LNQTSLVQR.E R.MIVTSADVLHWSAVPSLGVK.C R.ISHFYTNFQVDEIGR.V K.TAIADITLNQK.Q R.EVAAFAQFGSNLDAATOALLNR.G R.VLNTGSPITVPVGR.A R.DLVGVAYTEEEVK.A K.LSDRFPQPYNPEAAAR.F K.DVVSFLTWAEPMEER.K 2178 R.YFPTQALNFAFK.D K.AVVAQYNASQLITQR.E 1777 K.GEDFPAENYIVK.D K.NLQLLLTAGIGSDHVDLKA K.AAAAAGLTVAEVTGSNTVSAEDEL.M K.SISSGFGVLLK.E K.FASFETIVEMIK.H R.IVIGTI TGAQWGIYDAEK.V	Cytochrome oxidase subunit 2 - Ruscus aculeatus (Butcher's broom). ATP1 - Daucus carota (Carrot). ATP synthase alpha subunit (Fragment) - Palaquium formosanum. ATPase beta subunit - Nicotiana sylvestris (Wood tobacco). Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial precursor (Clone PC181) (Fragment) - Solanum tuberosum ADP,ATP carrier protein precursor - potato Prohibitin-like protein - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress). Formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2) - Lycopersicon esculentum (Tomato). Mitochondrial phosphate transporter - Lotus japonicus.	0,836 0,988 0,974 0,868 0,994 0,947 0,989 0,933 1,306 0,85 0,72	2,14 2,16 1,32 1,977 2,367 1,124 2,212 1,662 1,69 1,384 1,045 1,4 1,292 1,623	1,291 1,306 1,359 1,247 3,962 1,679 1,33 1,124 1,435 1,178 0,922 1,246 1,045 1,06 1,133 1,046	1,208 1,736 1,234
4	R.EVAAFAQFGSNLDAATOALLNR.G R.VLNTGSPITVPVGR.A R.EAPAFVEQATEQQILVTGIK.V R.VLNTGSPITVPVGR.A K.SSLDAFSQIVK.N R.QFNGLVDVYR.K 798 R.YFPTQALNFAFK.D K.SLFTVSGVEDTK.S K.KGDLFLADVNTQLK.N 1565 K.FSITTSPTGWITSSGSK.K 1763	ATP synthase alpha subunit (Fragment) - Palaquium formosanum. Putative ATP synthase beta subunit - Oryza sativa (japonica cultivar-group). Putative ATP synthase beta subunit - Oryza sativa (japonica cultivar-group). ADP/ATP translocator - Lycopersicon esculentum (Tomato). 34 kDa outer mitochondrial membrane protein porin (Voltage-dependent anion-selective channel)	1,046 0,698 0,776 1,355 0,884 0,95	1,38 2,673 2,275 1,785 1,756 1,785 1,392 2,108 2,337	1,824 1,359 1,247 3,962 1,679 1,33 1,124 1,435 1,178 0,922 1,246 1,045 1,06 1,133 1,046	1,208 1,736 1,234
5	R.EVAAFAQFGSNLDAATOALLNR.G R.VLNTGSPITVPVGR.A R.EAPAFVEQATEQQILVTGIK.V R.VLNTGSPITVPVGR.A K.SSLDAFSQIVK.N R.QFNGLVDVYR.K 798 R.YFPTQALNFAFK.D K.SLFTVSGVEDTK.S K.KGDLFLADVNTQLK.N 1565 K.FSITTSPTGWITSSGSK.K 1763	ATP synthase alpha subunit (Fragment) - Palaquium formosanum. Putative ATP synthase beta subunit - Oryza sativa (japonica cultivar-group). Putative ATP synthase beta subunit - Oryza sativa (japonica cultivar-group). ADP/ATP translocator - Lycopersicon esculentum (Tomato). 34 kDa outer mitochondrial membrane protein porin (Voltage-dependent anion-selective channel)	1,046 0,698 0,776 1,355 0,884 0,95	1,38 2,673 2,275 1,785 1,756 1,785 1,392 2,108 2,337	1,824 1,359 1,247 3,962 1,679 1,33 1,124 1,435 1,178 0,922 1,246 1,045 1,06 1,133 1,046	1,208 1,736 1,234
6	K.ESINSFQGVLDGK.Y R.VLNTGSPITVPVGR.A K.ESINSFQGVLDGK.Y R.LVLEVAQHLGENMVR.T R.IPSAVGYOPTLATDLGGLQER.I R.FDEGLPPLTALVLDNQIR.L 2277	ATPase beta subunit - Nicotiana sylvestris (Wood tobacco). H+-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) beta-1 chain, mitochondrial - curled-leaved tobacco	0,578 1,103	1,837 1,27 1,87 1,617 1,252		1,438 1,385 1,022
6	R.VLNTGSPITVPVGR.A R.EAPAFVEQATEQQILVTGIK.V R.IPSAVGYOPTLATDLGGLQER.I R.IADEVGLALWK.G 973 K.SSLDAFSQIVK.N R.QFNGLVDVYR.K R.YFPTQALNFAFK.D K.SLFTVSGVEDTK.S K.LISDATAAAGMGLIELR.R	H+-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) beta-1 chain, mitochondrial - curled-leaved tobacco ADP,ATP carrier protein precursor - potato Pom30 protein - Solanum tuberosum (Potato). AC128642 NID: - Oryza sativa (japonica cultivar-group) ADP/ATP translocator - Lycopersicon esculentum (Tomato).	1 1,09 1,02 0,968 0,954	1 1,645 1,657 1,775 2,238	0,895 0,871 1,163 1,146 1,35	1,25 1,17 1,518 1,188
6	R.VLNTGSPITVPVGR.A R.EAPAFVEQATEQQILVTGIK.V R.VLNTGSPITVPVGR.A R.IPSAVGYOPTLATDLGGLQER.I K.SSLDAFSQIVK.N R.YFPTQALNFAFK.D K.SLFTVSGVEDTK.S	H+-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) beta chain, mitochondrial - maize H+-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) beta-1 chain, mitochondrial - curled-leaved tobacco ADP,ATP carrier protein precursor - potato	0,68 0,74	1,837 2,84 1,8 0,896 0,733	1,292 1,349	1,42 1,42
8	K.DFPLSGYVEVR.Y R.FEVVYLLSIR.Y R.YDFASPFWEQR.S R.VVSEPIEMTQEFR.Y R.ISSVSLFSPAGWVER.E K.LATLNAISSR.R K.LANSVDLGTLR.D R.AFAYFVLTTGGR.F K.LANSVDLGTLRDPQDAFR.V	NADH-ubiquinone oxidoreductase 27 kDa subunit (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-27KD) (CI-) ATPase subunit 4 - Zea mays (Maize). ubiquinol-cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.2) Rieske iron-sulfur protein - potato	0,881 1,187 0,834 0,975 0,994	2,6 2,74 2,55 2,172 1,647 1,482 1,7 2,395 1,95	1,354 1,695 1,318 1,174 1,302 1,196 1,228	1,048 0,82 0,86 1,579
9	K.LATLNAISSR.R R.EVAAFAQFGSNLDAATOALLNR.G R.IQAIQEELOQFNPNNEVLLSENEQQ K.VAVEENTLIK.G R.SVSQLNMMQDMQSPFVAAPR.A 2	ATPase subunit 4 - Zea mays (Maize). ATP synthase alpha subunit (Fragment) - Palaquium formosanum. Orf25 protein - Beta vulgaris subsp. vulgaris. heat shock protein MTHSP precursor, mitochondrial - tomato	0,913 1,077 1,163 0,474 0,343	2,328 2,337 2 1,309	1,334 1,32 1,566 5,86	1,046 1,03
10	R.AFDDVNSLOTK.F K.LSTMTAEEYFAK.H K.FSQFPPEINWYYR.K	Putative mitochondrial ATP synthase - Solanum demissum (Wild potato).	1,112 1,035 0,825	1,498 2,193 2,199	1,653 1,752 1,67	1,297 0,971

- la sous-unité beta d'une ATPase mitochondriale (N° accession) dont la quantité est augmentée d'un facteur supérieur à 2.

Les résultats concernant la quantification relative de la protéine LeEF-Ts_{mt} sont en accord avec ceux obtenus sur l'étude de l'expression par PCR en temps réel du gène *LeEF-Ts_{mt}* dans les tissus sous-exprimant ou sur-exprimant ce gène (voir chapitre II, paragraphe 3.1). En effet, cette protéine est fortement représentée dans les cellules transformées en position "sens" corrélativement avec la forte sur-expression de *LeEF-Ts_{mt}*, alors que le très faible effet de la sous-expression dans les tissus "antisens" se traduit par de très faibles variations de la protéine (Fig III-6 B). Il est cependant intéressant de noter que les modifications observées sur la protéine MT-HSP semblent suivre celles de la protéine LeEF-Ts_{mt}, c'est-à-dire, une forte augmentation dans les tissus "sens" et une très faible diminution dans le cas des tissus "anti-sens" (Fig III- 6 A, B et C)

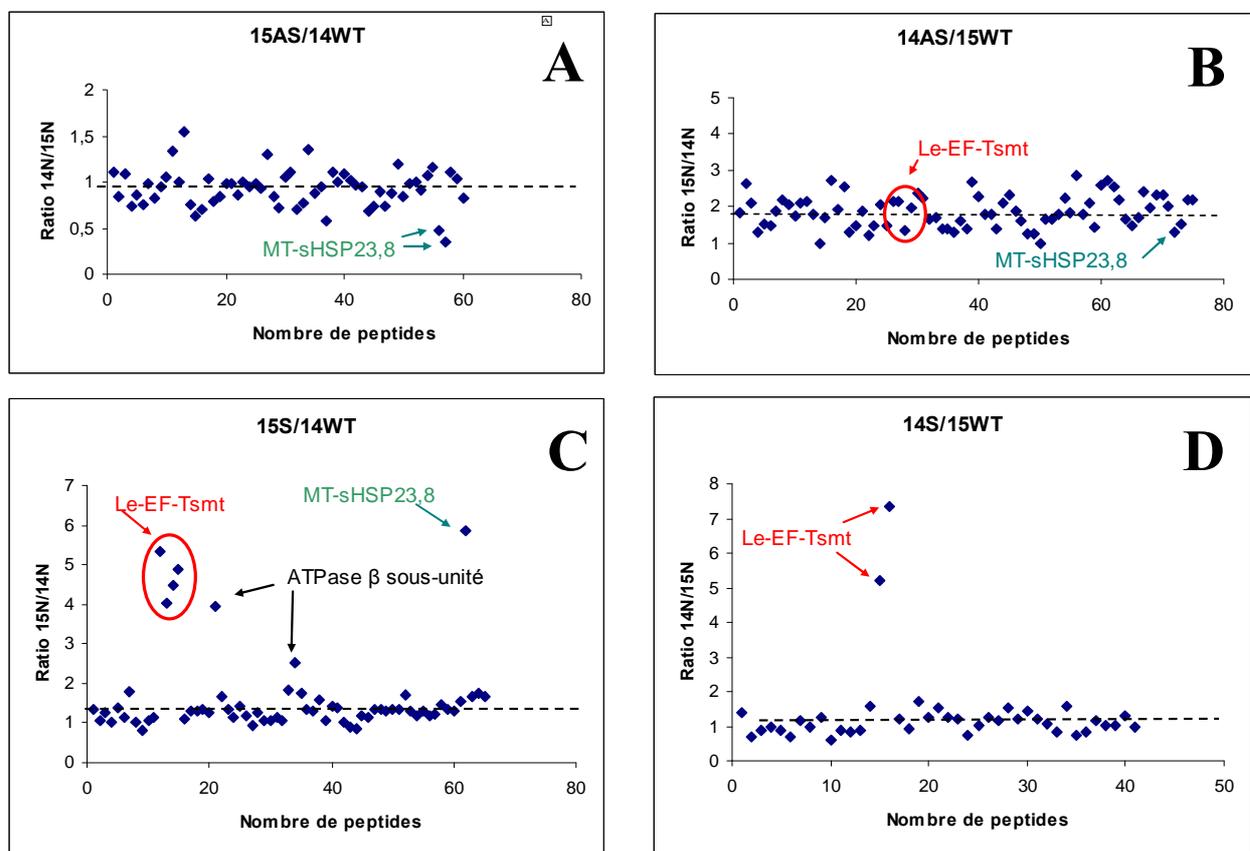


Figure III. 6. Variations des ratios des isotopes $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ dans les peptides issus de protéines mitochondriales de cals WT, sous-exprimant (AS) ou sur-exprimant (S) *LeEF-Ts_{mt}* analysés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse (LC/MS).

3.3 - Analyse globale du protéome mitochondrial

3.3.1 - Identification des protéines mitochondriales de la tomate.

Nous avons pu identifier 492 unigenes de tomate à partir du séquençage de peptides dont la fragmentation individuelle a été validée par le logiciel MASCOT (voir matériel et méthode). Chaque unigène a été assigné à une catégorie fonctionnelle en utilisant des divisions fonctionnelles communes (Heazlewood et al., 2004). Suite à cette analyse, 13 groupes fonctionnels ont été identifiés (Fig III-7). Parmi ces groupes fonctionnels, les plus fortement représentés dans l'ensemble du protéome mitochondrial sont ceux qui sont impliqués dans l'énergie (117), métabolisme (51), compartimentation (39) et synthèse protéique (33). Les protéines appartenant à ces groupes fonctionnels sont généralement des composants mitochondriaux bien caractérisés qui sont impliqués dans le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire, l'importation des protéines mitochondriales et la machinerie de synthèse et de dégradation de protéines. L'analyse des annotations a montré que 23 des protéines identifiées sont impliquées dans le mécanisme de transport, 14 protéines de stress et de détoxification, 14 impliquées dans le signal de traduction et communication cellulaire, 11 dans le processus de synthèse d'ARN, 2 protéines dans la structure et l'organisation cellulaire, 2 protéines impliquées dans la synthèse d'ADN et 2 de fonctions diverses. Cette même recherche ne nous a pas permis de prédire avec certitude une fonction pour 61 séquences protéiques que nous avons groupé en "protéines non classifiées". Aussi, de l'ensemble des protéines identifiées, 123 n'ont été validées que par la méthode LC/MS/MS.

3.3.2 - Comparaison avec d'autres orthologues mitochondriaux.

Les comparaisons par le programme blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) de l'ensemble de séquences de protéines identifiées dans la mitochondrie de la tomate avec celles d'*Arabidopsis* nous ont permis d'identifier 261 paires d'orthologues potentiels. De la même manière, nous avons réalisé une comparaison avec le protéome mitochondrial de l'homme et l'ensemble du protéome de *Rickettsia prowazekii* qui représente l'organisme vivant (bactérie) le plus proche de la mitochondrie. Cette analyse nous a permis d'identifier 91 et 142 orthologues potentiels respectivement.

3.3.3 -Prédictions bioinformatiques de l'adressage subcellulaire.

Nous avons réalisée une étude bioinformatique visant à prédire la localisation subcellulaire des protéines que nous avons identifié. Pour cela, nous avons recherché la présence de peptides signaux spécifique pour l'adressage mitochondriale en utilisant les logiciels Target (Emanuelsson et al., 2000), MitoProt II (Claros et Vincens, 1996) et Predotar (<http://www.inra.fr / predotar>). Ceci nous a permis de prédire l'adressage mitochondrial de 91, 66 et 57 protéines respectivement (Fig III-8).

L'ensemble des résultats issues de la recherches d'orthologues à de protéines mitochondriales connues ou issues de la recherche de peptides signaux d'adressage à la mitochondrie nous ont permis de valider 369 protéines parmi l'ensemble des 492 unigènes identifiées par MASCOT (voir tableau annexe). Les 123 protéines restantes, bien qu'étant été identifiées à partir de séquence obtenue par LC/MS/MS, sont des protéines dont nous n'avons pas trouvé d'orthologues chez *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* et *Rickettsia prowazkii* et aussi aucune prédiction d'adressage mitochondrial.

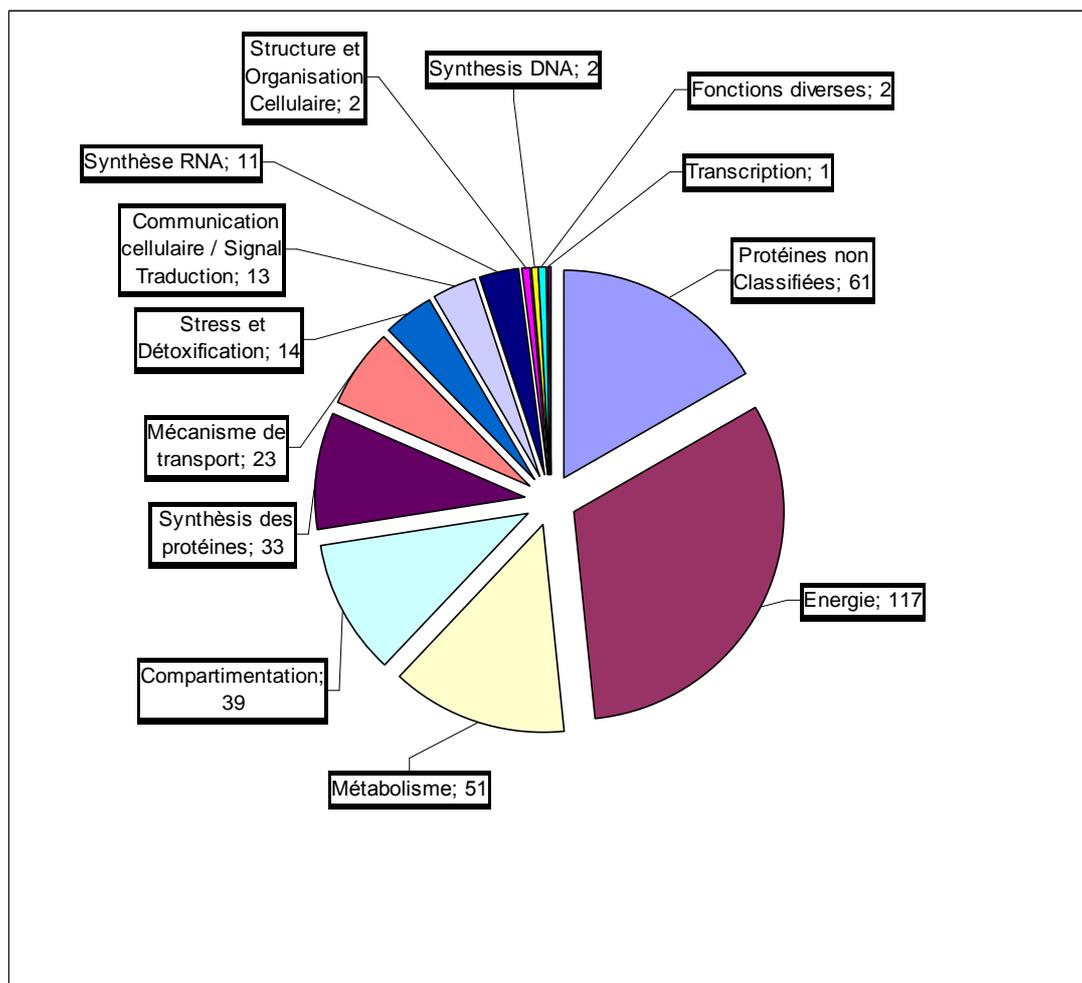


Figure III-7. Répartition des protéines du protéome mitochondrial de cal de tomate par groupes fonctionnels.

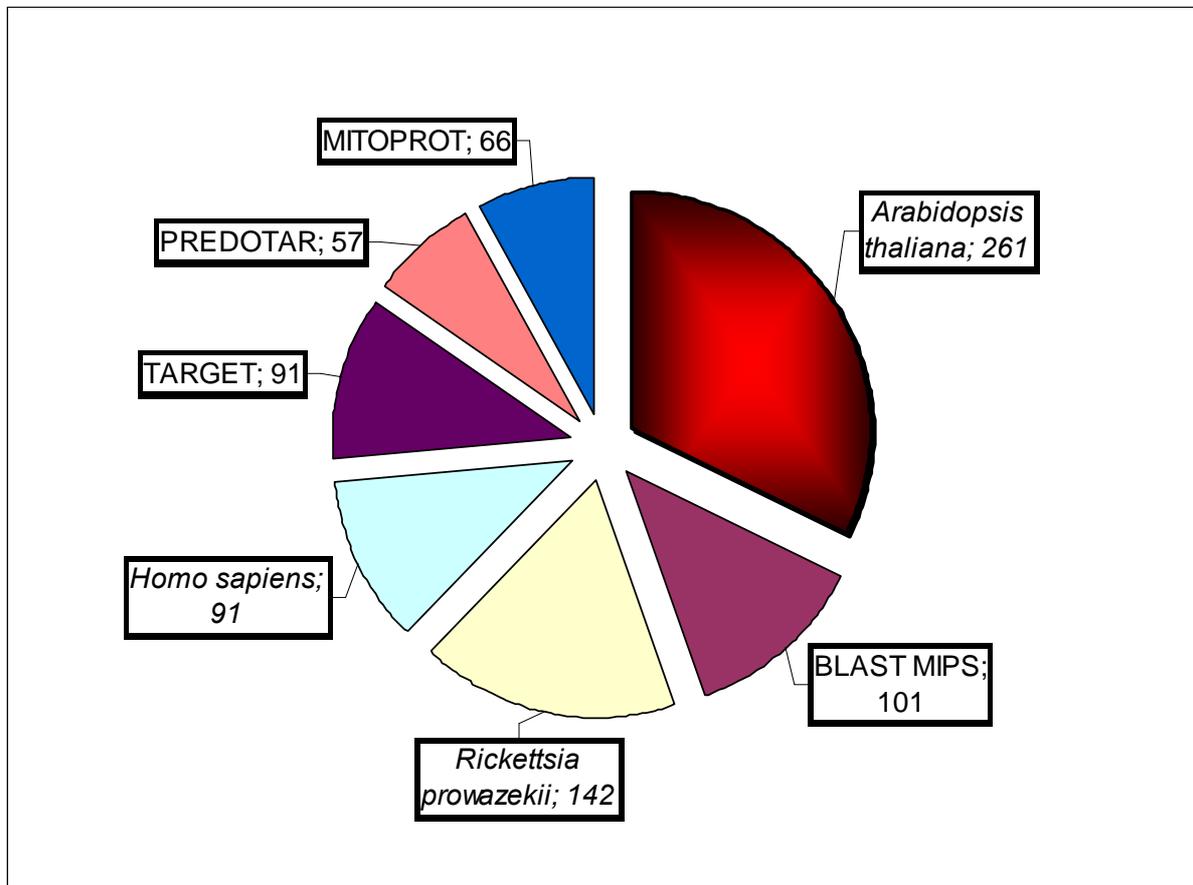


Figure III-9. Recherches des protéines orthologues de tomate dans les protéomes mitochondriaux d'*Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* et *Rickettsia prowazekii* à l'aide du programme Blastp et prédiction de l'adressage mitochondrial à l'aide des logiciels Target, MitoProt II et Predotar.

4 – Discussion et Conclusions

L'analyse partielle du protéome mitochondrial montre que la technique d'obtention et de purification des mitochondries mise en œuvre dans cette étude est très performante. En effet, parmi les protéines identifiées, très peu sont d'origine extra-mitochondriales. Le haut degré de pureté de ces organites est un élément déterminant pour engager l'étude des effets de la sous-expression ou de la sur-expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* sur les modifications du protéome mitochondrial.

Les principaux résultats obtenus dans ce travail à travers l'analyse du protéome après marquage des protéines à l'azote ¹⁵N, font apparaître que la transgénèse ne provoque pas de grands bouleversements tant qualitatifs que quantitatifs des protéines mitochondriales. L'absence ou le peu d'effet de la sous-expression de *LeEF-Ts_{mt}* s'explique par le peu d'efficacité du transgène en position antisens à inhiber l'expression du gène endogène (voir chapitre II). Par contre, la sur-expression de *LeEF-Ts_{mt}* contrôlée par la PCR en temps réel est en parfait accord avec la teneur en protéine LeEF-Ts_{mt} mesurée dans les mitochondries "sens". Ce résultat conforte la localisation de cette protéine dans la mitochondrie (Benichou et al., 2003).

La plus importante modification observée dans le protéome des mitochondries "sens" concerne l'augmentation, entre 4 et 5 fois, d'une petite "heat shock protein" mitochondriale de 23.8 kDa (MT-sHSP23.8) et les variations des teneurs de cette protéine sont concomitantes à celles observées pour LeEF-Ts_{mt}. Une possible fonction des HSP est associée au transport des protéines cytosoliques vers les organites.

Le gène codant cette MT-sHSP23.8 a été déjà clonée et caractérisé par Liu et Shono (1999) dans des tomates ayant subi un choc thermique. Il est maintenant connu que ce type de sHSP jouent un rôle important dans la protection des organites contre des stress hyperthermiques (De Jong et al., 1993). Plusieurs travaux montrent que ces sHSP agissent comme des chaperonnes (Lee et al., 1997). La fonction de chaperone de MT-sHSP a été démontré in vitro par Liu et Shono (1999). Il a été aussi démontré, par exemple, que cette MT-sHSP protège la NADH :ubiquinone oxidoreductase de la chaîne de transport d'électrons au cours d'un stress hyperthermique (Downs et Heckathorn, 1998). Plus récemment, il a été démontré que des plantes de tabac (Sanmiya et al., 2004) et de tomate (Nautiyal et al., 2005) surexprimant le gène LeMT-sHSP présentent une meilleure tolérance à la chaleur. Il sera intéressant de vérifier si l'augmentation de la MT-sHSP, due à la surexpression de *LeEF-Ts_{mt}*, provoque aussi une thermotolérance dans nos plants de tomates transgéniques.

DISCUSSION GENERALE

Chacun des trois chapitres de cette thèse comportent des discussions particulières. Nous nous proposons ici de discuter brièvement l'ensemble des résultats de façon plus intégrée.

Le gène *LeEF-Ts_{mt}* a été isolé après criblage par la méthode de «differential display» sur la base de la réponse de fruits de tomate à l'éthylène (Zegzouti et al., 1999). La caractérisation fonctionnelle du gène a été réalisée par expression dans *E.coli* et étude biochimique des propriétés de la protéine recombinante (Bénichou et al., 2003). Il a ainsi été démontré que le gène code bien pour un facteur d'élongation de la traduction capable de régénérer le GDP et de réaliser la synthèse peptidique en présence de EF-Tu. Par ailleurs, il a été démontré par introduction d'une construction du gène associée au gène rapporteur GFP dans des protoplastes de tabac que la protéine était bien ciblée dans la mitochondrie (Bénichou et al., 2003). Les analyses de protéomique réalisées dans cette thèse ont confirmé cette localisation mitochondriale. En raison de la stimulation de l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* par l'éthylène et du rôle de la mitochondrie dans la respiration, nous avons pensé que ce gène pourrait intervenir dans la crise climactérique respiratoire. Une telle hypothèse est également étayée par la forte stimulation de l'expression de ce gène pendant les premières étapes de la maturation, au moment où s'initie la crise climactérique. Les données d'expression par real-time PCR obtenues ici confirment parfaitement ce profil d'expression.

Cependant, malgré ces prédictions, l'analyse de la respiration de fruits dans lesquels le gène *LeEF-Ts_{mt}* a été sur- ou sous-exprimé ne montre aucun effet sur la crise climactérique et sur la synthèse d'éthylène. La stimulation de la respiration par blessure destinée à solliciter encore davantage le système respiratoire n'a pas non plus donné de différences entre les lignées de tomates sauvages et transformées. Comme nous l'avons indiqué dans la discussion du chapitre I, on ne peut pas attribuer cet absence d'effet dans les fruits transgéniques par un phénomène de compensation par un gène de la même famille car toutes les données d'EST et de séquençage disponibles à ce jour indiquent que ce gène est unique. Une explication possible consiste à penser que la sous-expression du gène dans les lignées antisens est insuffisante pour rendre la protéine limitante. Cependant les études d'expression par PCR en temp réel (chapitre II) et les analyses de protéomique (chapitre III) montrent en fait une expression faible au niveau des ARN et de la protéine. Il est probable, étant donné le rôle crucial de ce gène, que les plantes transformées ayant une forte sous-expression ne soient pas

viables ou se développent très faiblement, de sorte qu'elles n'ont pas été retenues au cours du processus de transformation. Malgré tout, il est troublant de constater que ce gène est assez fortement régulé lors de la maturation et par l'éthylène. D'ailleurs le 1-MCP inhibe son expression. Cependant, des mutants de non-maturation insensibles à l'éthylène présentent une expression importante, indiquant une expression basale constitutive indépendante de l'éthylène. La blessure qui stimule l'expression de *LeEF-Ts_{mt}* est connue pour stimuler la respiration d'une façon indépendante de l'éthylène (Bouquin et al. 1997).

Etant donné l'implication des mitochondries dans la régulation de la formation des espèces réactives d'oxygène (ROS), il était envisageable que la modification de la synthèse des protéines mitochondriales affecte la réponse des plantes aux stress oxydatifs. Nous avons en effet montré que la sensibilité aux stress oxydatifs évaluée chez les feuilles par la présence de nécrose et dans des cals par la croissance cellulaire est réduite chez les plantes antisens. L'activité de différentes enzymes connues pour intervenir dans la détoxification des ROS: superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX) et glutathione réductase (GR) a été évaluée. Nous avons montré que la GR et les APX ont une activité accrue chez les lignées antisens permettant d'expliquer, au moins en partie, leur meilleure tolérance aux stress.

Un des résultats intéressants de ce travail est la démonstration de la stimulation de l'expression du gène *LeEF-Ts_{mt}* sous l'effet de divers stress: chocs thermiques, sécheresse et paraquat. Le paraquat agit en catalysant le transfert d'électrons du photosystème I du chloroplaste vers l'oxygène conduisant à la formation d'anion superoxyde. Aucune observation de ce type n'a pas été rapporté chez d'autres plantes, mais il faut rappeler cependant que *LeEF-Ts_{mt}* est le premier gène caractérisé chez les plantes (Benichou et al., 2003). Une forte stimulation par la chaleur a été observée pour une protéine de type EF-Tu chloroplastique et de la protéine correspondante chez le maïs (Bhadula et al., 2001). On sait que les protéines EF-TU ont une fonction très étroitement liée à celle de EF-Ts en jouant le rôle de chaperonnes. Des protéines chaperones du type heat-shock (Hsp) sont connues pour intervenir dans le transport de protéines du cytosol vers la mitochondrie et pour stabiliser ces protéines dans des conditions de stress (Jinn et al., 1995). Zegzouti et al (1999) ont montré qu'un gène codant pour une protéine de type Hsp70, appelée ER21, est régulé par l'éthylène et possède un profil d'expression similaire à *LeEF-Ts_{mt}*. La protéine correspondante n'a pas été trouvée parmi les protéines mitochondriales indiquant qu'elle ne pouvait pas jouer le rôle de chaperonne pour *LeEF-Ts_{mt}*. Cependant, les résultats de l'analyse de mitochondries de plantes sur-exprimant le gène *LeEF-Ts_{mt}* ont une teneur 4 à 5 fois plus importante d'une petite

"heat shock protein" mitochondriale de 23.8 kDa (MT-sHSP23.8) et les variations des teneurs de cette protéine sont concomitantes à celles observées pour *LeEF-Ts_{mt}*. L'augmentation de MT-sHSP pourrait indiquer que cette HSP joue un rôle dans le ciblage et le transport de *LeEF-Ts_{mt}* vers ma mitochondrie, mais également dans la stabilisation. Ce problème est discuté à la fin du chapitre III. La démonstration d'une interaction entre *LeEF-TS_{mt}* et MT-sHSP23.8 reste à faire.

Une retombée importante du travail de protéomique entrepris dans cette thèse réside dans le séquençage du protéome de tomate. Les données sont fournies en annexe. Elles montrent que l'ensemble des résultats issues de la recherches d'orthologues à de protéines mitochondriales connues ou issues de la recherche de peptides signaux d'adressage à la mitochondrie nous ont permis de valider 369 protéines parmi l'ensemble des 492 unigènes identifiées par MASCOT. Les 123 protéines restantes, bien qu'étant été identifiées à partir de séquence obtenue par LC/MS/MS, sont des protéines dont nous n'avons pas trouvé d'orthologues chez *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* et *Rickettsia prowazkii* et aussi aucune prédiction d'adressage mitochondrial.

REFERENCES

- Abeles, F.B. 1992. *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press, New York,
- Abeles, F.B., Morgan, W.B., Saltveit, M.E. Jr. 1992. *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press, San Diego.
- Adato, I and Gazit, S. 1974. Water deficit stress, ethylene production and ripening in avocado fruits. *Plant physiol* 53, 45-46.
- Alba, R., Payton, P., Fei, Z., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G.B., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17, 2954–2965.
- Almeida, A.M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A.E., Sluse, F.E. 1999. Cyanide-resistant, AT-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during post-harvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiol.* 119, 1323-1329.
- Almeida, A.M., Navet, R., Jarmuszkiewicz, W., Vercesi, A.E, Sluse-Goffart, C.M., Sluse, F.E. 2002. The energy-conserving and energy-dissipating processes in mitochondria isolated from wild type and nonripening tomato fruits during development on the plant. *J. Bioenerg. Biomem.* 34, 487-498.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Amaya I, Botella MA, de la Calle M, Medina MI, Heredia A, Bressan RA, Hasegawa PM, Quesada MA, Valpuesta V. 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters* 457: 80-84.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Anderson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-140.
- Aono M, Saji H, Fujiyama K, Sugita M, Kondo N, Tanaka K. 1995. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology* 107: 645-648.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Of Plant Biology* 55: 373-399.
- Apel, K. y H. Hirt. 2004. Reactive oxigen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 373-399.
- Ayub R, Guis M, Ben Amor M *et al.* 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnol*, 14 : 862-866.
- Bailey, K. 1965. Pyrophosphate. *Methods of enzymatic analysis*. Ed. H.-U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Gmbh Weinheim/Bergstr. Academic Press, NY London.
- Baldwin, E.A. et al., 2000. Flavor trivia and tomato aroma : biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components, *HortSci.*, 35, 1013.
- Barker J. and Solomos T. 1962. The mechanism of the climacteric rise in respiration in banana fruit. *Nature*, 169:189-191.
- Barry, C.S., Blume, M. Bouzayen, W. Cooper, A.J. Hamilton, and D. Grierson. 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 9:525-535.

- Barry, C.S., Immaculada, L-T and Grierson, D. 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid synthetase gene expression during the transition from system 1 to system 2 ethylene synthesis in tomato. *Plant physiol.* 123, 979-986.
- Bartley, G.E. ; Ishida, B.K. 2003. Developmental gene regulation during tomato fruit ripening and in-vitro sepal morphogenesis. *BMC Plant Biology*, 3:4, 1-11.
- Bauchot, A.D. et al., 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe Charentais melon (cv. Védraçais), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4787.
- Beers, R.F. y I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol.Chem.* 195: 133-140.
- Benichou, M., Li, Z.-G., Tournier, B., Chaves, A., Zegzouti, H., Jauneau, A., Delalande, C., Latché, A., Bouzayen, M., Spremulli L., Pech, J.C. 2003. Tomato EF-TSmt, a functional mitochondrial translation elongation factor from higher plants. *Plant Mol. Biol.* 53, 411-422.
- Bennett A.B., Smith G.M. and Nichols B.G. 1987. Regulation of climacteric respiration in ripening avocado fruit. *Plant Physiol.* 83:973-976.
- Berg, O.G., and Kurland, C.G. 2000. Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol Biol Evol* 17, 951-961.
- Bhadula SK, Elthon TE, Habben JE, Helentjaris TG, Jiao S, Ristic Z. 2001. Heat-stress induced synthesis of chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) in a heat-tolerant maize line. *Planta* 212: 359-366.
- Biale J.B., Young R.E. and Olmstead A.J. 1954. Fruit respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* 29:168-174.
- Biale, J.B. 1964. Growth, maturation and senescence in fruits. *Science* 146:880-888.
- Bibb, M.J., Von Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., and Clayton, D.A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167-180.
- Bidonde, S., M.A. Ferrer, H. Zegzouti, S. Ramassamy, A. Latché, J.C. Pech, A.J. Hamilton, D. Grierson and M. Bouzayen. 1998. Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *Eur. J. Biochem.* 253:20-26
- Binder, S. and A. Brennicke. 2003. Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and posttranscriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1429): 181-9. biosynthesis. 25, 55-61.
- Blank, J., Grillenbeck, N. W., Kreutzer, R., and Sprinzl, M. 1995. Overexpression and purification of *Thermus thermophilus* elongation factors G, Tu, and Ts from *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 6: 637-645.
- Bouquin T, Lasserre E, Pradier J, Pech JC, Balague C. 1997. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways. *Plant Mol Biol* 35: 1029-1035
- Bower, J. et al., 2002. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of melon, *Postharvest Biol. Technol.*, 26, 135.
- Bozcuk A.N., Sumer, E.D. and Arisoy. 2004. Age-related enzyme activity in different genotypes of alcohol dehydrogenase (ADH) in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 5: 243-247.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brady C.J. 1987. Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:155-178.
- Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V., and Schuster, W. 1993. The mitochondrial genome on its way to the nucleus - Different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Letters* 325, 140-145.
- Brown, G. G., N. Formanova, H. Jin, R. Wargachuk, C. Dendy, P. Patil, M. Laforest, J. Zhang, W. Y. Cheung and B. S. Landry. 2003. The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic

- male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J* 35(2): 262-72.
- Brüggemann W, Beyer V, Brodka M, Poth H, Weil M, Stockhaus J. 1999. Antioxydants and antioxidative enzymes in wild-type and transgenic *Lycopersicon* genotypes of different chilling tolerance. *Plant Science* 140: 145-154.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Russell, L.J. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland).
- Bullard, J. M., Cai, Y.-C., Zhang, Y. and Spremulli, L. L. 1999. Effects of domain exchanges between *Escherichia coli* and mammalian mitochondrial EF-Tu on interaction with guanine nucleotides, aminoacyl-tRNA and ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1446: 102-114.
- Cai, Y.-C., Bullard, J. M., Thompson, N. L. and Spremulli, L. L. 2000a. Interaction of mammalian mitochondrial elongation factor EF-Tu with guanine nucleotides. *Prot. Sci.* 9: 1791-1800.
- Caldas TD, El Yaagoubi A, Richarme G. 1998. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 11478-11482.
- Chen, . W., H.-T. Kuo, T.S. Lu, S.-J. Wang y R.-Ch. Yang. 2004. Cytochrom c oxidase as target of the heat shock protective effect in septic liver. *Int. J. Exp. Path.* 85: 249-256.
- Chen, T.H.H. and Murata, N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes, *Curr. Op. Plant Biol.*, 5, 250.
- Chen, Y.-F., Randlett, M.D., Findell, J.L., Schaller, G.E., 2002. Localisation of ethylene
- Chervin, C. and C Thibaud. 1992. Inhibition of plant and animal cytochrome oxydases by nitrous oxide as a function of cytochrpme c concentration. *Biochimie*, 74: 1125-1127.
- Cisneros Prego, E., J. Pupo Balboa y E. Céspedes Miranda. 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed.* 16(1):10-15.
- Claros, M.G., and Vincens, P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779-786.
- Considine, M.J., Daley, D.O., Whelan, J. 2001. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiol.* 126, 1619-1629.
- Covello, P.S., and Gray, M.W. 1992. Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit-2 of cytochrome-c oxidase (cox2) in soybean - evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO J.* 11, 3815-3820.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P. 1995. Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 167-175.
- Cruz-Hernandez, A., Gomez-Lim, M.A. 1995. Alternative oxidase from Mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* 197,569-576.
- Dai, H., Lo, Y.-S., Jane, W.-N., Lee, L.-W., and Chiang, K.-S. 1998. Population heterogeneity of higher plant mitochondria in structure and function. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 198-209.
- Day, D.A. y J.T. Wiskich. 1995. Regulation of the alternative oxidase activity in higher plants. *J. Bioenerg Biomembr.* 27: 379-385.
- Day, D.A., J. Whelan, A.H. Millar, J.N. Siedow y J.T. Wiskich. 1995. Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. *Australian Journal of Plant Physiology.* 22: 497-509.
- De Jong, W., Leunissen, J.A.M., Voorter Christina, E.M. 1993. Evolution of a-cryotillin/small heat-shock proteins family. *Mol. Biol. Evol.* 10, 103-126.
- Diollez, P., De virville, J., Latché, A., Pech, J.C., Moreau F. and Reid M.S. 1986 Role of the mitochondria in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in plant tissues. *Plant Sci.* 43, 13-17.

- Downs, C.A., Heckathorn, S.A. 1998. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett.* 430, 246–250.
- Ecker JR. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268 : 667-675.
- Edwards, E.A., S. Rawsthorne y P.M. Mullineaux. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180: 278-284.
- Elo, A., Lyznik, A., Gonzalez, D.O., Kachman, S.D., and MacKensie, S.A. 2003. Nuclear genes encoding mitochondrial proteins for DNA and RNA metabolism are clustered in the Arabidopsis genome. *Plant Cell* 15, 1619–1631
- Elthon, T.E., R.L. Nickels y L. Mc Intosh. 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89: 1311-1317.
- F.E., 2002. The energy-conserving and energy-dissipating processes in mitochondria isolated from wild type and nonripening tomato fruits during development on the plant. *J. Bioenerg. Biomem.* 34, 487-498.
- Farrington JA, Ebert M, Land EJ, Fletcher K. 1973. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies on the reaction of paraquat radical with oxygen. Implication for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochem. Biophys. Acta* 314: 372-385.
- Fauron, C., Allen, J.W., Clifton, S., and Newton, K. 2004. Plant Mitochondrial Genomes. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, H. Daniell and C. Chase, (eds), in press.
- Felsenstein, J., 1992. PHYLIP (Univ. of Washington, Seattle), Version 3.5.
- Flores, F.; El Yahyaoui F.; De Billerbeck G. ; Romajaro F. ; Latché A. ; Bouzayen, M. ; Pech, J-C and Ambid, C. 2000. Role of ethylene in the biosynthesis pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.* 53, 201-206.
- Genevois, M. L. 1929. "Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens." *Revue Génétique Botanique* 41: 252-271.
- Gianinetti A, Cantoni M, Lorenzoni C, Salamini F, Marocco A. 1993. Altered levels of antioxidant enzymes associated with two mutations in tomato. *Physiologia Plantarum* 89: 157-164.
- Giovannoni, J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:725–49
- Giovannoni, J.J., 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17, 2954–2965.
- Gonzalez-Flecha, A., and Boveris, A. 1995. Mitochondrial sites of hydrogen peroxide in reperfused rat kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 361–366.
- Grant, J. J. and G. J. Loake. 2000. "Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance." *Plant Physiol* 124(1): 21-9.
- Gray, M.W. 2000. Mitochondrial genes on the move. *Nature* 408, 302-303, 305.
- Gray, M.W., and Doolittle, W.F. 1982. Has the endosymbiot hypothesis been proven *Microbiol. Rev.* 46, 1-42. Gray, M. W..
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Grierson D. 1987. Senescence in fruits. *HortScience*, 22 : 859-862.
- Guis M, Botondi R, Ben-Amor M *et al.*. 1997. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe Charentais melons expressing an ACC oxidase transgene. *J Amer Soc Hort Sci*, 122 : 748-751.
- Hamilton A.J, Lycett GW, Grierson D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346 : 284-287.
- Heath, M. C. 2000. "Hypersensitive response-related death." *Plant Mol Biol* 44(3): 321-34.

- Heazlewood J.L. *et al.*, 2004. Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins, *Plant Cell* 16, pp. 241–256.
- Heazlewood JL and Millar AH. 2005. AMPDB: The Arabidopsis Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Research* 33:D605-D610.
- Hemalatha K.P.J. and D. Siva Prasad. 2002. Purification, physicochemical properties, and subcellular location of alkaline inorganic pyrophosphatase from sesam (*Sesamum indicum* L.) cotyledons. *Biochem. Cell Biol.* 80:215-224.
- Henze, K., and Martin, W. 2001. How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet* 17, 383-387.
- Holtzapffel, R. C., J. Castelli, P.M. Finnegan, A.H. Millar, J. Whelan y D.A. Day. 2003. A tomato alternative oxidase protein with altered regulatory properties. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1606: 153-162.
- Holtzapffel, R.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Badger, M.R., Day, D.A. 2002. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold-storage. *Funct. Plant Biol.* 29, 827-834.
- Huang, J. and C. S. Levings, 3rd. 1995. "Functional analysis of a recently originating, atypical presequence: mitochondrial import and processing of GUS fusion proteins in transgenic tobacco and yeast." *Plant Mol Biol* 29(3): 519-33.
- Huq, S. and J. M. Palmer. 1978. "Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria." *FEBS Lett* 95(2): 217-20.
- Jacob-Wilk, D., D. Holland, E.E. Goldschmidt, J. Riov and Y. Eyal. 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.* 20:653-661.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem.* 23, 403-405.
- Jinn, T.L., Chen, Y.M., Lin, C.Y., 1995. Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat-shock protein complex in soybean. *Plant Physiol.* 108,693-701.
- Jobling J, McGlasson WB, Dilley DR. 1991. Induction of ethylene synthesizing competency in Granny Smith apples by exposure to low temperature in air. *Postharvest Biol Technol*, 1 : 111-118.
- Jones, B., Frasse, P., Olmos, E., Zegzouti, H., Li, Z.-G., Latché, A., Pech, J.C., Bouzayen, M., 2002. Down-regulation of an ARF-like gene in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark-green and blotchy ripening fruit. *The Plant J.* 32, 603-614.
- Kader AA. 1997. Biological bases of O₂ and CO₂ effects on postharvest life of horticultural perishables. *In : Proc. Seventh Intl. Controlled Atmospheres Res. Conf. Vol 4, Vegetables and Ornamental* , 13-18 July, Davis CA, 160-163.
- Kanellis AK, Solomos T, Roubelakis-Angelakis K. 1990. Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. *Plant Physiol*, 96 : 269-274.
- Kidd F., and West. 1925. The course of respiratory activity throughout the life of an apple. *Rep. Food Invest. Board for the year 1924, DSIR, London*, pp 27-33.
- Knee M, Looney NE, Hatfield SGS, Smith SM. 1983. Initiation of rapid ethylene synthesis by apple and pear fruits in relation to storage temperature. *J Exp Bot*, 34 : 1207-1212.
- Kovtun, Y., W. L. Chiu, G. Tena and J. Sheen. 2000. "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2940-5.
- Krab IM, Biesebeke Rt, Bernardi A, Parmeggiani A. 2001. Elongation factor Ts can act as a steric chaperone by increasing the solubility of nucleotide binding-impaired elongation factor-Tu. *Biochemistry* 40: 8531-8535.

- Kumar S, Patil BC, Sinha SK. 1990. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 30;168(2):818-22.
- Kumar, S., Patil, B.C., Sinha, S.K. 1990. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 818-822.
- Kumazawa, Y., Schwartzbach, C., Liao, H.-X., Mizumoto, K., Kaziro, Y., Watanabe, K., and Spremulli, L. L. 1991. Interaction of bovine mitochondrial phenylalanyl-tRNA with ribosomes and elongation factors from mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1090: 167-172.
- Laloi, C., K. Apel and A. Danon. 2004. "Reactive oxygen signalling: the latest news." *Curr Opin Plant Biol* 7(3): 323-8.
- Lam, K.W., L. Wang, B.S. Hong y D. Treble. 1993. Purification of phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr Eye Res.* 12(1):9-15.
- Laties, G.G. 1982. The cyanide-resistant alternative oxidase pathway in plant mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology.* 33: 519-555.
- Lee, G.L., Roseman, A.M., Saibil, H.R., Vierling, E. 1997. A small heat shock protein stable binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-component state. *EMBO J.* 16, 659–671.
- Lelièvre JM, Latché A, Jones B *et al.* 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol Plant*, 101 : 727-739.
- Liu, J., Shono, M. 1999. Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Physiol.* 40, 1297–1304.
- Mackenzie, S.A., and McIntosh, L. 1999. Higher Plant Mitochondria. *Plant Cell* 11, 571-585.
- Marcellin, P. 1992. Les maladies physiologiques du froid. In "Les végétaux et le froid" (Ed D Côme) pp 53-105. (Hermann : Paris).
- Maxwell, D.P., Y. Wang y L. McIntosh. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8271-8276.
- McCord, J.M. y I. Fridowich. 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocytin). *The Journal of Biological Chemistry.* 244 (22): 6049-6055.
- McGlasson, W.B., Pratt, H.K. 1964. Effects of wounding on respiration and ethylene production by Cantaloupe fruit tissue. *Plant Physiol.* 39, 128-132.
- McIntosh, L. 1994. Molecular Biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* 105: 781-786.
- McMurchie, E.J., McGlasson, W.B., and Eaks, I.L., Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene, *Nature*, 237, 235, 1972.
- Meeuse, B. J. D. 1975. "Thermogenic respiration in aroids." *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 117-126.
- Meister, A., and Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.
- Merrick, W C. 1992. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* June; 56(2): 291-315
- Millar A.H. and Heazlewood, J.L. 2003. Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 131, pp. 443–453.
- Millar A.H., L.J. Sweetlove, P. Giegé and J. Leaver. 2001. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiology.* 127: 1711-1727.
- Millar AH, Heazlewood JL, Kristensen B, Bruan HP, Moller IM. 2005. The Plant Mitochondrial Proteome. *Trends in Plant Science* 10:36-43. Impact Factor: 13.4
- Millar AH, Heazlewood JL, Kristensen BK, Braun HP, Moller IM. 2005. The plant Mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* Jan;10(1):36-43. Review.
- Miller, D. L. and Weissbach, H. 1970. Interactions between the elongation factors: the displacement of GDP from the Tu-GDP complex by factor Ts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38: 1016-1022.

- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M. 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell and Environment* 26: 845-856.
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M. 2004. Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* - a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant, Cell and Environment* 27: 237-250.
- Mohamed EA, Iwaki T, Munir I, Tamoi M, Shigeoka S, Wadano A. 2003. Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplasts enhances photo-oxidative stress tolerance. *Plant, Cell and Environment* 26: 2037-2046.
- Møller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.
- Moller, I.M. 2002. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. *Trends Plant Sci* 7, 235-237.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures." *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murray AJ, Hobson GE, Schuch W, Bird C. 1993. Reduced ethylene synthesis in EFE antisense tomatoes has differential effects on fruit ripening processes. *Postharvest Biol Technol*, 2 : 301-303.
- Nautiyal P. C., Shono M, Egawa, Y. 2005. Enhanced thermotolerance of the vegetative part of MT-sHSP transgenic tomato line *Scientia Horticulturae* 105, 393-409.
- Neupert, W. 1997. "Protein import into mitochondria." *Annu Rev Biochem* 66: 863-917.
- Nickerson, R.G., T. J. Tworokski y D. G. Luster. 1993. *Colletotrichum coccodes* and thidiazuron alter specific peroxidase activities in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 43, 47-56.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione : keeping active oxygen under control. *Annual Review Of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Nugent, J.M., and 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.
- Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP *et al.* 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254 : 437-439.
- Page, R.D.M., 1996. TREE VIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Perl-Trees R, Galun E. 1991. The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology* 17: 745-760.
- Pfanner, N. and M. Meijer. 1997. "The Tom and Tim machine." *Curr Biol* 7(2): R100-3. phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Picton S, Barton S, Bouzayen M *et al.* 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J*, 3 : 461-481.
- Pirrung, M., Brauman, J.I. 1987. Involvement of cyanide in the regulation of ethylene
- Polidoros AN, Mylone PV, Scandalios JG. 2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize *Cat2* gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research* 10: 555-569. Press, San Diego.
- Pyon, J. Y., R.Z. Piao, S.W. Roh, S.Y. Shin y S.S. Kwak. 2004. Differential levels of antioxidants in parquat-resistant and -susceptible *Erigeron candiensis* biotypes in Korea. *Weed Biology and Managment.* 4: 75-80.

- Ravel, J. M., Shorey, R. L., Garner, C. W., Dawkins, R. C. and Shive, W. 1969. The role of an aminoacyl-tRNA-GTP-protein complex in polypeptide synthesis. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 34: 321-330.
- Rich, P. R. and W. D. Bonner, Jr. 1978. "An EPR analysis of cyanide-resistant mitochondria isolated from the mutant poky strain of *Neurospora crassa*." *Biochim Biophys Acta* 504(3): 345-63.
- Rudd, J. J. and V. E. Franklin-Tong. 2003. "Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*." *J Exp Bot* 54(380): 141-8.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sanmiya, K., Suzuki, K., Egawa, Y., Shono, M. 2004. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 557, 265–268.
- Sato T and Theologis A. 1989. Cloning of the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:6621-6625.
- Scandalios JG. 1997 Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. In: Scandalios JG (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, pp. 527-568. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider and U. Fechner. 2004. Advances in the prediction of protein targeting signals, *Proteomics* 4, pp. 1571–1580
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD. 1993. Overexpression of superoxide dismutase protects plants oxidative stress. *Plant Physiology* 103: 1067-1073.
- Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27, 916-921.
- Sluse FE & Jarmuszkiewicz W. 1998. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31: 733-747.
- Sluse, F.E. & Jarmuszkiewicz, W. 2000. Dynamics of H⁺ fluxes in mitochondrial membrane; in *Handbook of Plant Growth: pH as a Master Variable in Plant Growth* (Rengel, Z., ed.) Marcel Dekker, Inc. New York
- Solomos, T. and A.K. Kanellis. 1997. Hypoxia and fruit ripening, p. 239-252. In: A.K. Kanellis, C. Chang, H. Kende and D. Grierson. (eds.). *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Solomos, T. 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 279-297.
- Spanu, P, D.G. Grosskopf, G. Felix, and T. Boller. 1994. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiol.* 106:529-535.
- Sprinzi, M. 1994. Elongation factor Tu: A regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* 19: 245-250.
- Stepanova, A. N. and J. R. Ecker. 2000. Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Cur. Op. Plant Biol.* 3:353–360
- Sulse, F.E. and Jarmuszkiewicz. 1998. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 31: 733-747.
- Tesnière, C. y C. Verriès. 2000. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Science*, 157: 77-88.
- Theologis A, Oeller PW, Wong LM *et al.* 1993. Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study ripening, a complex developmental process. *Devel Genet*, 14 : 282-295.
- Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genet.* 15, 57-61.

- Van Der Straeten, D., L. Van Wiemeersch, H.M. Goodman, M. Van Montagu. 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:4859-4863.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh. 1992. "Alternative oxidase: from gene to function." *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 703-734.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh. 1997. "ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 703-734.
- Vanlerberghe, G.C. y L. McIntosh. 1997. Alternative oxidase: From gene to function. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 703-734.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A.E., and 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.
- Von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G. 1989. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* **180**, 535-545.
- Vranova, E., D. Inze and F. Van Breusegem. 2002. "Signal transduction during oxidative stress." *J Exp Bot* **53**(372): 1227-36.
- Wagner, A. M. and A. L. Moore. 1997. "Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism." *Biosci Rep* **17**(3): 319-33.
- Wang CY. 1989. Chilling injury of fruits and vegetables. *Food Rev International*, **5** : 209-236.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., and Pfanner, N. 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 14473-14476.
- Wilkinson, J.G., Lanahan, M.B., Conner, T.W., Klee, H.J. 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology*, **27**: 1097-1108.
- Yang SF, Hoffman NE. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, **35** : 155-189.
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 665-670.
- Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Jo JK, Kim JS, Cho KY, Kwa SS. 2000. Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *Journal of Plant Physiology* **156**: 504-509.
- Zachara B.A. 1991. Mamalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* **6**(3):137-45.
- Zegzouti, H., B. Jones, P. Frasse, C. Marty, B. Maître, A. Latché, J.C. Pech and M. Bouzayen. 1999. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening related genes isolated by differential display. *Plant J.* **18**:589-600.

ANNEXES

Numero	UNIGENE	pfam name	pfam desc	Biological Process	Fonction Moléculaire	Cellular Component	Fonction	LC/MS/MS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BLAST MIPS	Bactérie	Humain	TARGET	PREDOTAR	MITOPROT
1	sgn U225510	Fer4	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)		Energy	OUI	AT1G79010.1	OUI	OUI		OUI	OUI	OUI
2	sgn_U225511	Fer4	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)		Energy	OUI	AT1G79010.1	OUI	OUI		OUI	OUI	OUI
3	sgn_U225514	Gp_dh_C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glycolysis (GO:0006096)	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity (GO:0004365)		Energy	OUI	AT1G13440.1						OUI
4	sgn_U225527	RuBisCO_small	Ribulose bisphosphate carboxylase, small chain	carbon utilization by fixation of carbon dioxide (GO:0015977)	ribulose-bisphosphate carboxylase activity (GO:0016984)	ribulose bisphosphate carboxylase complex (sensu Magnoliophyta) (GO:0009573)	Unknown	OUI							
5	sgn_U225530	ELFV_dehydrog_N	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, dimerisation region	amino acid metabolism (GO:0006520)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT5G18170.1	OUI		OUI	OUI		
6	sgn_U212838	GTP_EFTU_D3	Elongation factor Tu, C-terminal		GTP binding (GO:0005525)		Protein Synthesis	OUI	AT5G60390.1		OUI	OUI			
7	sgn_U212845	GTP_EFTU	Protein synthesis factor, GTP-binding	protein biosynthesis (GO:0006412)	GTP binding (GO:0005525)		Protein Synthesis	OUI	AT5G60390.1		OUI	OUI			
8	sgn_U212847	GTP_EFTU	Protein synthesis factor, GTP-binding	protein biosynthesis (GO:0006412)	GTP binding (GO:0005525)		Protein Synthesis	OUI	AT5G60390.1		OUI	OUI			
9	sgn_U212795	Peptidase_M16	Peptidase M16, N-terminal				Protein Fate	OUI	AT3G02090.1		OUI				
10	sgn_U212553	Ribosomal_L5_C	Ribosomal protein L5	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI			OUI				
11	sgn_U212640	HSP90	Heat shock protein Hsp90	protein folding (GO:0006457)	unfolded protein binding (GO:0051082)		Protein Fate	OUI	AT4G24190.1	oui	OUI				
12	sgn_U212643	HATPase_c	ATP-binding region, ATPase-like		ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT2G04030.1	oui	OUI				
13	sgn_U212687	Catalase	Catalase, N-terminal	electron transport (GO:0006118), response to oxidative stress (GO:0006979)	catalase activity (GO:0004096)		Defence Stress and Detoxification	OUI	AT4G35090.1		OUI				
14	sgn_U212696	HSP20	Heat shock protein Hsp20				Protein Fate	OUI					OUI	OUI	OUI
15	sgn_U212746	Pro_isomerase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	protein folding (GO:0006457)			Protein Fate	OUI							
16	sgn_U212714	Ldh_1_N	Lactate/malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism (GO:0006100)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT5G58330.1						

17	sgn_U212730	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)	voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G67500.1				
18	sgn_U212768	Arf	ARF/SAR superfamily		GTP binding (GO:0005525)		Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT2G22290.1		OUI	OUI	OUI
19	sgn_U212764						Unclassified Protein	OUI					
20	sgn_U212765	ADH_zinc_N	Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing		zinc ion binding (GO:0008270), oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI					
21	sgn_U212761	Rieske	Rieske [2Fe-2S] region	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT5G13430.1	OUI	OUI	OUI	OUI
22	sgn_U212825	Enolase_N	Enolase	glycolysis (GO:0006096)	phosphopyruvate hydratase activity (GO:0004634)		Energy	OUI			oui		
23	sgn_U212777	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)		RNA Processing	OUI	AT4G13850.1		oui		
24	sgn_U212817	NifU	Nitrogen-fixing NifU, C-terminal				Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI			OUI		
25	sgn_U212857	efhand	Calcium-binding EF-hand		calcium ion binding (GO:0005509)		Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI					
26	sgn_U212890	CBS	CBS				Metabolism Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G10860.1		OUI	OUI	OUI
27	sgn_U212911	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT3G08580.1		OUI		
28	sgn_U212989	Bet_v_I	Bet v I allergen				Unknown	OUI					
29	sgn_U212968	Glycolytic	Fructose-bisphosphate aldolase, class-I	glycolysis (GO:0006096)	fructose-bisphosphate aldolase activity (GO:0004332)		Energy	OUI	AT2G01140.1		OUI	OUI	OUI
30	sgn_U212969	ATP-synt_DE_N	H+-transporting two-sector ATPase, delta/epsilon subunit	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933) (GO:0046961)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	Energy	OUI	AT5G47030.1		OUI		
31	sgn_U212994	2-Hacid_dh_C	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD-binding	L-serine biosynthesis (GO:0006564)	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor (GO:0016616)		Metabolism	OUI	AT5G14780.1		OUI	OUI	OUI
32	sgn_U213055						Unknown	OUI					
33	sgn_U213119	Glycos_transf_1	Glycosyl transferase, group 1	biosynthesis (GO:0009058)			Protein Synthesis	OUI		OUI	OUI	OUI	OUI

34	sgn_U213153	Ribosomal_S4	Ribosomal protein S4	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI						
35	sgn_U213194	Ribosomal_S7	Ribosomal protein S7	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI				OUI		
36	sgn_U213204	IMPDH	IMP dehydrogenase/GMP reductase		catalytic activity (GO:0003824)		Protein Fate	OUI	AT4G37910.1			OUI		
37	sgn_U213255	Pollen_Ole_e_I	Pollen Ole e 1 allergen and extensin				Unknown	OUI						
38	sgn_U213261	Tim17	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit Tim17/22	protein transport (GO:0015031)	protein transporter activity (GO:0008565)	mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	Energy	OUI	AT2G42210.1				OUI	
39	sgn_U213307	Ribosomal_L37ae	Ribosomal L37ae protein	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Energy	OUI	AT5G50850.1			OUI		
40	sgn_U213330	NDK	Nucleoside diphosphate kinase	GTP biosynthesis (GO:0006183), UTP biosynthesis (GO:0006228), CTP biosynthesis (GO:0006241)	nucleoside diphosphate kinase activity (GO:0004550), ATP binding (GO:0005524)		Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT4G11010.1			OUI		
41	sgn_U213331	HSP70	Heat shock protein Hsp70		ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT5G09590.1			OUI	OUI	OUI
42	sgn_U213361	Succ_DH_flav_C	Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein, C-terminal	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT5G66760.1			OUI		
43	sgn_U213386	Ribosomal_L11	Ribosomal protein L11	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI						
44	sgn_U213394	Ldh_1_N	Lactate/malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism (GO:0006100)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT1G53240.1			OUI		
45	sgn_U213402	GCV_H	Glycine cleavage H-protein	glycine catabolism (GO:0006546)		glycine cleavage complex (GO:0005960)	Metabolism	OUI	AT1G32470.1			OUI	OUI	OUI
46	sgn_U213425	Methionine_synt	Methionine synthase, vitamin-B12 independent	methionine biosynthesis (GO:0009086)	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity (GO:0003871)		Protein Synthesis	OUI				OUI	OUI	
47	sgn_U213432	UCR_14kD	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14 kDa subunit	electron transport (GO:0006118), mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c (GO:0006122)	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity (GO:0008121)		Energy	OUI	AT5G25450.1					
48	sgn_U213490	TPR_1	TPR repeat				Protein Fate	OUI	AT5G09420.1					

49	sgn_U213556	Ribosomal_S24e	Ribosomal protein S24e	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI							
50	sgn_U213541	peroxidase	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial	response to oxidative stress (GO:0006979)	peroxidase activity (GO:0004601)		Defence Stress and Detoxification	OUI							
51	sgn_U213573	Cytochrom_C1	Cytochrome c1	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)	mitochondrial electron transport chain (GO:0005746)	Energy	OUI	AT5G40810.1	OUI	OUI				
52	sgn_U213584	Ribosomal_S13	Ribosomal protein S13	protein biosynthesis (GO:0006412)	RNA binding (GO:0003723), structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI			OUI				
53	sgn_U213585	Ribosomal_S13	Ribosomal protein S13	protein biosynthesis (GO:0006412)	RNA binding (GO:0003723), structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI		OUI	OUI				
54	sgn_U213579	Thioredoxin	Thioredoxin-related	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)		Defence Stress and Detoxification	OUI	AT5G60640.1		OUI				
55	sgn_U213569	Aminotran_1_2	Aminotransferase, class I and II	biosynthesis (GO:0009058)	transferase activity, transferring nitrogenous groups (GO:0016769)		Metabolism	OUI	AT1G17290.1		OUI		OUI		
56	sgn_U213570						Metabolism	OUI	AT1G17290.1				OUI		
57	sgn_U213596	Biotin_lipoyl	Biotin/lipoyl attachment				Energy	OUI	AT5G55070.1				OUI	OUI	OUI
58	sgn_U213597	2-oxoacid_dh	Catalytic domain of components of various dehydrogenase complexes	metabolism (GO:0008152)	acyltransferase activity (GO:0008415)		Energy	OUI	AT5G55070.1		OUI				
59	sgn_U213605	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G19760.1		OUI		OUI		
60	sgn_U213606	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G19760.1				OUI		
61	sgn_U213635	Aminotran_3	Aminotransferase class-III		transaminase activity (GO:0008483), pyridoxal phosphate binding (GO:0030170)		Metabolism	OUI	AT3G22200.1				OUI	OUI	OUI
62	sgn_U213653	Aldehyd	Aldehyde dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT3G48000.1				OUI	OUI	OUI
63	sgn_U213650	Aconitase	Aconitate hydratase, N-terminal	metabolism (GO:0008152)	lyase activity (GO:0016829)		Energy	OUI	AT2G05710.1				OUI		
64	sgn_U213651						Energy	OUI	AT4G26970.1				OUI	OUI	OUI
65	sgn_U213652	Aconitase_C	Aconitate hydratase, C-terminal	metabolism (GO:0008152)	hydro-lyase activity (GO:0016836)		Energy	OUI	AT2G05710.1		OUI		OUI		

66	sgn_U213654	ATP-synt_ab_C	H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, C-terminal	ATP biosynthesis (GO:0006754), ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933), (GO:0046961)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	Energy	OUI	AT5G08690.1	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
67	sgn_U213655	ATP-synt_ab	H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, central region	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933) (GO:0046961)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	Energy	OUI	AT5G08690.1	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
68	sgn_U213662	B12D	B12D				Unknown	OUI						
69	sgn_U213681	DUF506	Protein of unknown function DUF506, plant				Unknown	OUI						
70	sgn_U213716	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)		Protein Synthesis	OUI	AT5G61030.1					
71	sgn_U213745	Dehydrin	Dehydrin	response to stress (GO:0006950), response to water (GO:0009415)			Unknown	OUI						
72	sgn_U213753	HATPase_c	ATP-binding region, ATPase-like		ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT4G24190.1	OUI				
73	sgn_U213793						Unclassified Protein	OUI			OUI	OUI	OUI	
74	sgn_U213885	V-ATPase_G	Vacuolar (H+)-ATPase G subunit				Unknown	OUI						
75	sgn_U213872	Oxidored_q6	NADH ubiquinone oxidoreductase, 20 kDa subunit	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone (GO:0006120)	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)		Energy	OUI	AT5G11770.1	OUI				
76	sgn_U213912	GCV_T	Glycine cleavage T protein (aminomethyl transferase)	glycine catabolism (GO:0006546)	aminomethyltransferase activity (GO:0004047)	cytoplasm (GO:0005737)	Metabolism	OUI			OUI	OUI	OUI	
77	sgn_U213941	Sod_Fe_C	Manganese and iron superoxide dismutase	superoxide metabolism (GO:0006801)	superoxide dismutase activity (GO:0004784), metal ion binding (GO:0046872)		Defence Stress and Detoxification	OUI	AT3G10920.1	OUI				OUI
78	sgn_U213988	AAA	AAA ATPase, central region		ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT2G29080.1	OUI	OUI			
79	sgn_U214064	ATP-synt	H+-transporting two-sector ATPase, gamma subunit	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933) (GO:0046961)	membrane (GO:0016020)	Energy	OUI	AT2G33040.1	OUI	OUI			
80	sgn_U214083	PALP	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, beta subunit	metabolism (GO:0008152)	catalytic activity (GO:0003824)		Metabolism	OUI	AT3G61440.1		OUI	OUI	OUI	OUI

81	sgn_U214106	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G46800.1		OUI
82	sgn_U214155	adh_short	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	metabolism (GO:0008152)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT1G49670.1	OUI	OUI
83	sgn_U214173	NDK	Nucleoside diphosphate kinase	GTP biosynthesis (GO:0006183), UTP biosynthesis (GO:0006228), CTP biosynthesis (GO:0006241)	nucleoside diphosphate kinase activity (GO:0004550), ATP binding (GO:0005524)		Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT4G11010.1	OUI	OUI
84	sgn_U214170	peroxidase	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial	response to oxidative stress (GO:0006979)	peroxidase activity (GO:0004601)		Defence Stress and Detoxification	OUI	AT4G08390.1		
85	sgn_U214220	AUX_IAA	AUX/IAA protein	regulation of transcription (GO:0045449)		nucleus (GO:0005634)	Unknown	OUI			
86	sgn_U214237	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G14040.1		OUI
87	sgn_U214249						Unknown	OUI			
88	sgn_U214272	Fer2	Ferredoxin	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489), iron ion binding (GO:0005506)		Energy	OUI	AT5G40650.1	OUI	OUI
89	sgn_U214273	Fer2	Ferredoxin	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489), iron ion binding (GO:0005506)		Energy	OUI	AT5G40650.1	OUI	OUI
90	sgn_U214337	Transket_pyr	Transketolase, central region				Unknown	OUI			
91	sgn_U214338	Transketolase_N	Transketolase, N-terminal				Unknown	OUI			
92	sgn_U214350						Unknown	OUI			
93	sgn_U214410						Energy	OUI	AT3G52300.1		OUI
94	sgn_U214420	Transket_pyr	Transketolase, central region				Energy	OUI	AT5G50850.1	OUI	OUI
95	sgn_U214460	Bet_v_l	Bet v I allergen				Unknown	OUI			
96	sgn_U214473						Energy	OUI	AT2G21870.1		

97	sgn_U214520	Ribosomal_L23eN	Ribosomal protein L23, N-terminal				Protein Synthesis	OUI							
98	sgn_U214537	ACBP	Acyl-coA-binding protein, ACBP			acyl-CoA binding (GO:000062)	Metabolism	OUI					OUI		
99	sgn_U214563	Pyr_redox_2	NULL				Energy	OUI	AT3G17240.1		OUI		OUI		
100	sgn_U214564	Pyr_redox_2	NULL				Energy	OUI	AT1G48030.1		OUI		OUI	OUI	
101	sgn_U214575	MIF	Macrophage migration inhibitory factor				Unknown	OUI							
102	sgn_U214570	Invertase_neut	Plant neutral invertase				Unknown	OUI							
103	sgn_U214573	Aldedh	Aldehyde dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)		oxidoreductase activity (GO:0016491)	Metabolism	OUI	AT5G62530.1				OUI		
104	sgn_U214583	tRNA-synt_1c	Glutamyl-tRNA synthetase, class Ic	glutamyl-tRNA aminoacylation (GO:0006424)		glutamate-tRNA ligase activity (GO:0004818), ATP binding (GO:0005524)	RNA processing	OUI				OUI			
105	sgn_U214585	IMPDH	IMP dehydrogenase/GMP reductase			catalytic activity (GO:0003824)	Unclassified Protein	OUI	AT1G72270.1						
106	sgn_U214615	OSCP	H+-transporting two-sector ATPase, delta (OSCP) subunit	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)		hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933) (GO:0046961)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469),	Energy	OUI	AT5G13450.1			OUI	OUI	
107	sgn_U214616	Ligase_CoA	ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase	metabolism (GO:0008152)		catalytic activity (GO:0003824)		Energy	OUI	AT2G20420.1		OUI		OUI	OUI
108	sgn_U214691	AOX	Alternative oxidase	respiratory gaseous exchange (GO:0007585)			mitochondrial membrane (GO:0005740)	Energy	OUI	AT3G22370.1			OUI	OUI	OUI
109	sgn_U214705	TIM	Triosephosphate isomerase	metabolism (GO:0008152)		triose-phosphate isomerase activity (GO:0004807)		Energy	OUI	AT2G21170.1				OUI	
110	sgn_U214718	Iso_dh	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)		oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT5G03290.1		OUI			
111	sgn_U214772	TPR_1	TPR repeat				Protein Fate	OUI	AT5G09420.1						
112	sgn_U214778						DNA Synthesis and Processing	OUI	AT3G15000.1						
113	sgn_U214779						DNA Synthesis and Processing	OUI	AT3G15000.1			OUI	OUI	OUI	

114	sgn_U214828	GDC-P	Glycine cleavage system P-protein	glycine metabolism (GO:0006544)	glycine dehydrogenase (decarboxylating) activity (GO:0004375)	glycine dehydrogenase complex (decarboxylating) (GO:0005961)	Metabolism	OUI	AT4G33010.1							
115	sgn_U214865	Ligase_CoA	ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase	metabolism (GO:0008152)	catalytic activity (GO:0003824)		Energy	OUI	AT5G23250.1				OUI			
116	sgn_U214866	Ligase_CoA	ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase	metabolism (GO:0008152)	catalytic activity (GO:0003824)		Energy Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT5G23250.1				OUI			
117	sgn_U214875	AIG1	AIG1		GTP binding (GO:0005525)			OUI								
118	sgn_U214899	Cytochrom_C	Cytochrome c, class I	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)		Energy	OUI	AT1G22840.1				OUI	OUI		
119	sgn_U214950						Unknown	OUI								
120	sgn_U214952	Cpn60_TCP1	Chaperonin Cpn60/TCP-1	cellular protein metabolism (GO:0044267)	protein binding (GO:0005515), ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT3G23990.1				OUI	OUI	OUI	OUI
121	sgn_U214953						Protein Fate	OUI	AT3G23990.1				OUI	OUI	OUI	OUI
122	sgn_U214969	Band_7	Band 7 protein				Protein Fate	OUI	AT4G28510.1				OUI			
123	sgn_U214970						Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI					OUI			
124	sgn_U214996	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)	voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)		OUI	AT3G01280.1							
125	sgn_U215032	MAM33	Mitochondrial glycoprotein		mitochondrial matrix (GO:0005759)	mitochondrial matrix (GO:0005759)	Miscellaneous Function	OUI	AT2G39795.1				OUI		OUI	
126	sgn_U215030	Malate_synthase	Malate synthase	glyoxylate cycle (GO:0006097), tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	malate synthase activity (GO:0004474)		Energy	OUI								
127	sgn_U215053	Bac_surface_Ag	Bacterial surface antigen (D15)				Unknown	OUI					OUI	OUI		
128	sgn_U215087	GCV_H	Glycine cleavage H-protein	glycine catabolism (GO:0006546)	glycine cleavage complex (GO:0005960)	glycine cleavage complex (GO:0005960)	Metabolism Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT1G32470.1				OUI	OUI	OUI	
129	sgn_U215104	Ras	Ras GTPase	small GTPase mediated signal transduction (GO:0007264)	GTP binding (GO:0005525)			OUI	AT2G22290.1							
130	sgn_U215132						Unclassified Protein	OUI	AT3G55250.1							

131	sgn_U215170						Energy	OUI	AT1G59900.1		OUI		
132	sgn_U215171	E1_dh	Dehydrogenase, E1 component	metabolism (GO:0008152)	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, disulfide as acceptor (GO:0016624)		Energy	OUI	AT1G59900.1		OUI	OUI	OUI
133	sgn_U215229	HSP90	Heat shock protein Hsp90	protein folding (GO:0006457)	unfolded protein binding (GO:0051082)		Protein Fate	OUI	AT3G07770.1		OUI		
134	sgn_U215267	Pyr_redox_2	NULL				Defence Stress and Detoxification	OUI	AT1G63940.1		OUI		
135	sgn_U215277						Unknown	OUI					
136	sgn_U215318	Sod_Fe_C	Manganese and iron superoxide dismutase	superoxide metabolism (GO:0006801)	superoxide dismutase activity (GO:0004784), metal ion binding (GO:0046872)		Defence Stress and Detoxification	OUI	AT3G10920.1		OUI	OUI	OUI
137	sgn_U215324						Unknown	OUI					
138	sgn_U215374	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)	voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT3G01280.1				
139	sgn_U215379						Unclassified Protein	OUI	AT2G46540.1				
140	sgn_U215415	Glutaredoxin	Glutaredoxin	electron transport (GO:0006118), cell redox homeostasis (GO:0045454)	electron transporter activity (GO:0005489)		Energy	OUI			OUI	OUI	OUI
141	sgn_U215433						Unknown Cellular Communication / Signal Transduction	OUI					
142	sgn_U215479	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)			OUI					
143	sgn_U215491						Unknown	OUI					
144	sgn_U215498	PD40	WD40-like Beta Propeller				Unknown	OUI			OUI		
145	sgn_U215504	PD40	WD40-like Beta Propeller				Unknown	OUI			OUI		
146	sgn_U215543						Unknown	OUI			OUI		

164	sgn_U216006						Unknown	OUI				OUI			
165	sgn_U216013						Metabolism	OUI	AT1G47260.1			OUI			
166	sgn_U216018	PP2C	Protein phosphatase 2C-like				Metabolism	OUI				OUI			
167	sgn_U216036	L51_S25_CI-B8	Mitochondrial ribosome				Protein Synthesis	OUI				OUI		OUI	OUI
168	sgn_U216067	Band_7	Band 7 protein				Miscellaneous Function	OUI	AT4G27585.1			OUI		OUI	
169	sgn_U216084	Profilin	Profilin/allergen	cytoskeleton organization and biogenesis (GO:0007010)	actin binding (GO:0003779)	actin cytoskeleton (GO:0015629)	Unknown	OUI							
170	sgn_U216103						Unclassified Protein	OUI				OUI		OUI	
171	sgn_U216108	Molybdopterin	Molybdopterin oxidoreductase				Energy	OUI	AT5G37510.1			OUI			
172	sgn_U216130	2-oxoacid_dh	Catalytic domain of components of various dehydrogenase complexes	metabolism (GO:0008152)			Energy	OUI	AT3G13930.1			OUI			
173	sgn_U216163						Unclassified Protein	OUI	AT2G45060.1						
174	sgn_U216212	Iso_dh	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)			Energy	OUI	AT4G35260.1			OUI		OUI	OUI
175	sgn_U216214	ADH_zinc_N	Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing				Metabolism	OUI						OUI	OUI
176	sgn_U216221	Ribosomal_L17	Ribosomal protein L17	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI				OUI		OUI	
177	sgn_U216222	Ribosomal_L17	Ribosomal protein L17	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI				OUI		OUI	
178	sgn_U216252						Defence Stress and Detoxification	OUI	AT5G42150.1						
179	sgn_U216253	ETC_C1_NDUFA5	ETC complex I subunit	electron transport (GO:0006118)			Energy	OUI	AT5G52840.1						
180	sgn_U216320	ATP-synt_G	Mitochondrial ATP synthase g subunit	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	Energy	OUI				OUI			

181	sgn_U216362	GRIM-19	GRIM-19					Energy	OUI	AT2G33220.1					
182	sgn_U216408							Energy	OUI	AT2G20360.1				OUI	
183	sgn_U216422							Energy	OUI	AT1G49140.1					
184	sgn_U216470	EFG_IV	Elongation factor G, domain IV			GTP binding (GO:0005525)		Protein Synthesis	OUI	AT2G45030.1		OUI		OUI	
185	sgn_U216536	PLDc	Phospholipase D/Transphosphatidylase	metabolism (GO:0008152)		catalytic activity (GO:0003824)		Metabolism	OUI			oui			
186	sgn_U216619							Unknown	OUI			OUI			
187	sgn_U216646	Complex1_LYR	Complex 1 LYR protein	electron transport (GO:0006118)		oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH (GO:0016651)	mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	Energy	OUI			OUI			
188	sgn_U216679	Aminotran_1_2	Aminotransferase, class I and II	biosynthesis (GO:0009058)		transferase activity, transferring nitrogenous groups (GO:0016769)		Metabolism	OUI	AT1G17290.1		OUI	OUI	OUI	OUI
189	sgn_U216726	Complex1_17_2kD	NADH:ubiquinone oxidoreductase 17.2 kD subunit	electron transport (GO:0006118)		electron transporter activity (GO:0005489), NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)	mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	Energy	OUI	AT3G03100.1		OUI			
190	sgn_U216738	Peptidase_M16	Peptidase M16, N-terminal					Protein Fate	OUI	AT3G02090.1		OUI			
191	sgn_U216751	Band_7	Band 7 protein					Protein Fate	OUI	AT5G40770.1					
192	sgn_U216755	PBD	PAK-box/P21-Rho-binding					Unknown	OUI						
193	sgn_U216757							Unclassified Protein	OUI					OUI	OUI
194	sgn_U216763	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)		voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	Protein Fate	OUI	AT3G20000.1				OUI	
195	sgn_U216764	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)		voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	Protein Fate	OUI	AT3G20000.1		OUI			
196	sgn_U216771	ECH	Enoyl-CoA hydratase/isomerase	metabolism (GO:0008152)		catalytic activity (GO:0003824)		Metabolism	OUI	AT4G31810.1		OUI		OUI	
197	sgn_U216772	DUF1138	Protein of unknown function DUF1138					Energy	OUI	AT4G00860.1		oui			

198	sgn_U216796	NAD_binding_1	Oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity (GO:0016491)	Cellular Structural Organization	OUI	AT5G20080.1		OUI	OUI	OUI
199	sgn_U216829					Unclassified Protein	OUI	AT5G27540.1		OUI		
200	sgn_U216857	PPR	Pentatricopeptide repeat			RNA Processing	OUI	AT4G35850.1				
201	sgn_U216887					Unclassified Protein	OUI			OUI		
202	sgn_U216891	GTP_EFTU_D3	Elongation factor Tu, C-terminal		GTP binding (GO:0005525)	Protein Synthesis	OUI	AT4G02930.1		OUI	OUI	
203	sgn_U216974	Citrate_synt	Citrate synthase	main pathways of carbohydrate metabolism (GO:0006092)	transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer (GO:0046912)	Energy Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT2G44350.1		OUI	OUI	
204	sgn_U216980	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)	voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	OUI	AT3G01280.1				
205	sgn_U216981	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)	voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	OUI	AT3G01280.1				
206	sgn_U217019	HIT	Histidine triad (HIT) protein			Unclassified Protein	OUI			OUI	OUI	
207	sgn_U217049	Aldo_ket_red	Aldo/keto reductase		oxidoreductase activity (GO:0016491)	Unknown Cellular Communication / Signal Transduction	OUI					
208	sgn_U217091	efhand	Calcium-binding EF-hand		calcium ion binding (GO:0005509)		OUI				OUI	
209	sgn_U217220	AhpC-TSA	Alkyl hydroperoxide reductase/Thiol specific antioxidant/ Mal allergen			Defence Stress and Detoxification	OUI	AT3G06050.1				
210	sgn_U217256	Thioredoxin	Thioredoxin-related	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)	Defence Stress and Detoxification	OUI	AT5G60640.1	OUI	OUI		
211	sgn_U217303					Unknown	OUI					
212	sgn_U217344					Unknown	OUI					
213	sgn_U217413	Yippee	Yippee-like protein			Unknown	OUI		OUI			
214	sgn_U217416					Unclassified Protein	OUI		OUI	OUI	OUI	

215	sgn_U217417						Metabolism	OUI	AT3G07480.1			OUI	OUI	OUI
216	sgn_U217432	Allene_ox_cyc	Allene oxide cyclase				Unknown	OUI						OUI
217	sgn_U217487	GST_N	Glutathione S-transferase, N-terminal				Defence Stress and Detoxification	OUI	AT1G02930.1		OUI			
218	sgn_U217535	Ribosoma_L19	Ribosomal protein L19	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI						
219	sgn_U217629	GTP_EFTU	Protein synthesis factor, GTP-binding	protein biosynthesis (GO:0006412)	GTP binding (GO:0005525)		Protein Synthesis	OUI	AT4G02930.1			OUI	OUI	
220	sgn_U217656	ETF_alpha	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)		Energy	OUI	AT1G50940.1				OUI	
221	sgn_U217729						Unclassified Protein	OUI	AT4G39690.1					
222	sgn_U217762	Cytochrom_C1	Cytochrome c1	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)	mitochondrial electron transport chain (GO:0005746)	Energy	OUI	AT5G40810.1			OUI	OUI	
223	sgn_U217766	BoA	BoA-like protein		transcription regulator activity (GO:0030528)		Transcription	OUI					OUI	
224	sgn_U217789						Protein Fate Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G50920.1			OUI		
225	sgn_U217801	HMA	Heavy metal transport/detoxification protein	metal ion transport (GO:0030001)	metal ion binding (GO:0046872)			OUI					OUI	OUI
226	sgn_U217813	ADK	Adenylate kinase	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)	ATP binding (GO:0005524), nucleotide kinase activity (GO:0019201)		Metabolism	OUI	AT5G63400.1		OUI	OUI		
227	sgn_U217937	PMSR	Methionine sulfoxide reductase A	protein metabolism (GO:0019538)	protein-methionine-S-oxide reductase activity (GO:0008113)		Unknown	OUI						
228	sgn_U217925						Unknown	OUI						
229	sgn_U217960	Caleosin	Caleosin related				Unknown	OUI				OUI		
230	sgn_U218012						Unclassified Protein	OUI				OUI		OUI
231	sgn_U218032						Unknown	OUI						OUI

232	sgn_U218061						Unknown	OUI				
233	sgn_U218067	TOM20_plant	Plant specific mitochondrial import receptor subunit TOM20	mitochondrial outer membrane protein import (GO:0045040)	protein binding (GO:0005515)	mitochondrial outer membrane translocase complex (GO:0005742)	Protein Fate	OUI	AT1G27390.1	OUI		
234	sgn_U218083						Unknown	OUI				
235	sgn_U218104	Ldh_1_N	Lactate/malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism (GO:0006100)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT1G53240.1	OUI	OUI	
236	sgn_U218122	PPR	Pentatricopeptide repeat				RNA Processing	OUI	AT4G36680.1			OUI
237	sgn_U218202						Unknown	OUI				
238	sgn_U218323	HSP70	Heat shock protein Hsp70		ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT4G37910.1	OUI	OUI	
239	sgn_U218348						Unclassified Protein	OUI	AT1G19140.1			
240	sgn_U218350						Energy	OUI	AT1G47420.1			
241	sgn_U218362						Metabolism	OUI	AT3G48680.1		OUI	
242	sgn_U218474						Unknown	OUI		OUI		
243	sgn_U218501	DUF1138	Protein of unknown function DUF1138				Energy	OUI	AT4G00860.1			
244	sgn_U218553	UPF0041	Protein of unknown function UPF0041		molecular function unknown (GO:0005554)		Unclassified Protein	OUI	AT4G22310.1			
245	sgn_U218550	Peptidase_M16	Peptidase M16, N-terminal				Protein Fate	OUI	AT1G51980.1		OUI	
246	sgn_U218562						Unclassified Protein	OUI		OUI		OUI
247	sgn_U218573	Aldedh	Aldehyde dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT1G79440.1		OUI	
248	sgn_U218598	MIP	Major intrinsic protein	transport (GO:0006810)	transporter activity (GO:0005215)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI				OUI

249	sgn_U218616	MCM	MCM	DNA replication initiation (GO:0006270)	DNA binding (GO:0003677), ATP binding (GO:0005524), DNA-dependent ATPase activity (GO:0008094)	Unknown	OUI					
250	sgn_U218633					Energy	OUI	AT3G10860.1				
251	sgn_U218651	Complex1_51K	Respiratory-chain NADH dehydrogenase domain, 51 kDa subunit	electron transport (GO:0006118)	iron ion binding (GO:0005506), oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH (GO:0016651), NAD binding (GO:0051287)	Energy	OUI	AT5G08530.1		OUI		
252	sgn_U218699	Pyr_redox_2				Energy	OUI	AT4G05020.1		OUI	OUI	
253	sgn_U218740	PGM_PMM_III	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase alpha/beta/alpha domain III	carbohydrate metabolism (GO:0005975)	intramolecular transferase activity, phosphotransferases (GO:0016868)	Unknown	OUI					
254	sgn_U218764	ADH_zinc_N	Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing		zinc ion binding (GO:0008270), oxidoreductase activity (GO:0016491)	Energy	OUI	AT1G49670.1		OUI		
255	sgn_U218775	Pro_isomerase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	protein folding (GO:0006457)		Unknown	OUI					
256	sgn_U218793	ATP-synt_ab_N	H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, N-terminal	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933) (GO:0046961)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	Energy	OUI				
257	sgn_U218868	Biotin_lipoyl	Biotin/lipoyl attachment			Unclassified Protein	OUI			OUI	OUI	
258	sgn_U218966	Complex1_LYR	Complex 1 LYR protein	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH (GO:0016651)	mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	Energy	OUI	AT3G12260.1		OUI	OUI
259	sgn_U218983					Energy	OUI	AT1G08480.1				
260	sgn_U219008	Pro_isomerase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	protein folding (GO:0006457)		Protein Fate	OUI				OUI	
261	sgn_U219051	OTU	Ovarian tumour, otubain			Unknown	OUI					
262	sgn_U219059	zf-Tim10_DDP	Zinc finger, Tim10/DDP-type	protein-mitochondrial targeting (GO:0006626), mitochondrial inner membrane protein import (GO:0045039)		mitochondrial inner membrane protein insertion complex (GO:0042721)	Protein Fate	OUI			OUI	
263	sgn_U219066	FabA	NULL			Unknown	OUI				OUI	

264	sgn_U219131					Unknown	OUI				
265	sgn_U219133	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)	Protein Synthesis	OUI	AT5G61030.1		OUI	OUI
266	sgn_U219215					Unknown	OUI				OUI
267	sgn_U219213	E1_dh	Dehydrogenase, E1 component	metabolism (GO:0008152)	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, disulfide as acceptor (GO:0016624)	Energy	OUI	AT1G59900.1		OUI	
268	sgn_U219231	ADK	Adenylate kinase	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)	ATP binding (GO:0005524), nucleotide kinase activity (GO:0019201)	Metabolism	OUI	AT5G63400.1		OUI	
269	sgn_U219299					Unknown	OUI				
270	sgn_U219346					Energy	OUI	AT2G27730.1			
271	sgn_U219367	Cpn10	Chaperonin Cpn10	protein folding (GO:0006457)	ATP binding (GO:0005524)	Protein Fate	OUI	AT1G14980.1		OUI	OUI
272	sgn_U219411	CBFD_NFYB_HMF	Transcription factor CBF/NFY/archaeal histone		DNA binding (GO:0003677)	Unknown	OUI				
273	sgn_U219432	Aminotran_3	Aminotransferase class-III		transaminase activity (GO:0008483), pyridoxal phosphate binding (GO:0030170)	Metabolism	OUI	AT3G22200.1			OUI
274	sgn_U219444	Pyr_redox	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	electron transport (GO:0006118)	disulfide oxidoreductase activity (GO:0015036)	Defence Stress and Detoxification	OUI	AT1G63940.1		OUI	OUI
275	sgn_U219456	Ribosomal_L23	Ribosomal L23 protein	protein biosynthesis (GO:0006412)	RNA binding (GO:0003723), structural constituent of ribosome (GO:0003735)	Protein Synthesis	OUI		intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	OUI	OUI
276	sgn_U219510	FAD_binding_4	FAD linked oxidase, N-terminal	electron transport (GO:0006118)		Metabolism	OUI	AT3G47930.1			OUI
277	sgn_U219613					Unclassified Protein	OUI	AT4G14695.1		OUI	
278	sgn_U219628	UPF0041	Protein of unknown function UPF0041		molecular function unknown (GO:0005554)	Unknown	OUI				
279	sgn_U219653					Unclassified Protein	OUI			OUI	OUI

280	sgn_U219679							Unclassified Protein	OUI		OUI				
281	sgn_U219681	Ribosomal_L14	Ribosomal protein L14b/L23e	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)		Protein Synthesis	OUI		OUI		OUI	OUI	OUI
282	sgn_U219686							Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI						
283	sgn_U219704	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)		Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G46800.1		OUI			
284	sgn_U219736	B12D	B12D					Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI						
285	sgn_U219745							Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI			OUI			
286	sgn_U219750	Porin_3	Porin, eukaryotic type	anion transport (GO:0006820)	voltage-gated ion-selective channel activity (GO:0008308)	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)		Energy	OUI	AT5G57490.1					
287	sgn_U219784	DUF1640	Protein of unknown function DUF1640					Energy	OUI	AT2G16460.1			OUI	OUI	OUI
288	sgn_U219810							Protein Fate	OUI	AT2G19080.1					
289	sgn_U219828							Unknown	OUI			OUI			
290	sgn_U219826	ATP-synt_ab_C	H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, C-terminal	ATP biosynthesis (GO:0006754), ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)		Energy	OUI	AT5G08690.1		OUI	OUI		
291	sgn_U219909	Lyase_1	Fumarate lyase					Energy	OUI	AT2G47510.1		OUI	OUI		
292	sgn_U219990							Protein Fate	OUI	AT4G37910.1		OUI			
293	sgn_U220056							Unknown	OUI						
294	sgn_U220078	Aldedh	Aldehyde dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)		oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT1G79440.1		OUI	OUI		
295	sgn_U220098	Aldedh	Aldehyde dehydrogenase	metabolism (GO:0008152)		oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT3G48000.1		OUI	OUI	OUI	OUI
296	sgn_U220164							Energy	OUI	AT3G03070.1				OUI	OUI

297	sgn_U220194	Ribosomal_L1	Ribosomal protein L1	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI		OUI	OUI				
298	sgn_U220382						Unclassified Protein	OUI						OUI	
299	sgn_U220460						RNA Processing	OUI	AT1G26460.1						
300	sgn_U220551	Band_7	Band 7 protein				Protein Fate	OUI	AT5G40770.1						
301	sgn_U220568	UCR_UQCRX_QCR9	Ubiquinol-cytochrome C reductase, UQCRXQCR9 like	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c (GO:0006122)	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity (GO:0008121)	mitochondrial membrane (GO:0005740)	Energy	OUI	AT3G52730.1					OUI	
302	sgn_U220603						Unclassified Protein	OUI			OUI			OUI	
303	sgn_U220605						Metabolism	OUI	AT3G47930.1						
304	sgn_U220637	Myb_DNA-binding	Myb, DNA-binding			DNA binding (GO:0003677)	Unknown	OUI							
305	sgn_U220789	bZIP_2	Basic leucine zipper	regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)		DNA binding (GO:0003677)	Unknown	OUI							
306	sgn_U220797						Unknown	OUI			OUI				
307	sgn_U220906	G-patch	D111/G-patch			nucleic acid binding (GO:0003676)	Unknown	OUI							
308	sgn_U220921						Unclassified Protein	OUI					OUI	OUI	OUI
309	sgn_U220925						Unclassified Protein	OUI					OUI	OUI	OUI
310	sgn_U221033	Acyl-CoA_dh_N	Acyl-CoA dehydrogenase, N-terminal	electron transport (GO:0006118)		acyl-CoA dehydrogenase activity (GO:0003995)	Metabolism	OUI	AT3G45300.1			OUI	OUI	OUI	OUI
311	sgn_U221091	Str_synth	Strictosidine synthase	biosynthesis (GO:0009058)		strictosidine synthase activity (GO:0016844)	Unknown	OUI							
312	sgn_U221206						Energy	OUI	AT5G65750.1					OUI	
313	sgn_U221220	MRP-L47	Mitochondrial 39-S ribosomal L47	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	mitochondrial ribosome (GO:0005761)	Protein Synthesis	OUI			OUI				

314	sgn_U221352	FMN_dh	FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity (GO:0016491)	Energy	OUI					
315	sgn_U221368	Pyrophosphatase	Inorganic pyrophosphatase	metabolism (GO:0008152)	magnesium ion binding (GO:0000287), pyrophosphatase activity (GO:0016462)	Metabolism	OUI		OUI		OUI	
316	sgn_U221372					Unknown	OUI					
317	sgn_U221455	ECH	Enoyl-CoA hydratase/isomerase	metabolism (GO:0008152)	catalytic activity (GO:0003824)	Metabolism	OUI	AT4G31810.1				OUI
318	sgn_U221460	Frataxin_Cyay	Frataxin-like			Unclassified Protein	OUI		OUI		OUI	OUI
319	sgn_U221505					Unknown	OUI					
320	sgn_U221582					Energy	OUI	AT5G08530.1			OUI	
321	sgn_U221605	Actin	Actin/actin-like		protein binding (GO:0005515)	Cellular Structural Organization	OUI	AT3G12110.1				
322	sgn_U221662					Unknown	OUI					
323	sgn_U221685					RNA Processing	OUI	AT1G60770.1		OUI		
324	sgn_U221770	2-oxoacid_dh	Catalytic domain of components of various dehydrogenase complexes	metabolism (GO:0008152)	acyltransferase activity (GO:0008415)	Energy	OUI	AT3G52200.1			OUI	
325	sgn_U221776	Ldh_1_N	Lactate/malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism (GO:0006100)	oxidoreductase activity (GO:0016491)	Energy	OUI	AT3G47520.1			OUI	OUI
326	sgn_U221882					Unknown	OUI					OUI
327	sgn_U221991	Psf1	GINS complex, Psf1 component			Unknown	OUI					OUI
328	sgn_U222073					Unknown	OUI					
329	sgn_U222363	AAA	AAA ATPase, central region		ATP binding (GO:0005524)	Protein Fate	OUI	AT5G53170.1			OUI	OUI
330	sgn_U222371	CPSase_L_D2	Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding		ATP binding (GO:0005524)	Protein Fate	OUI		OUI		OUI	OUI

331	sgn_U222372						Unclassified Protein	OUI		OUI			OUI		
332	sgn_U222375						Unknown	OUI							
333	sgn_U222485						Protein Fate	OUI	AT3G07770.1		OUI				
334	sgn_U222626						Unknown	OUI							
335	sgn_U222670						Unknown	OUI							
336	sgn_U222672						Unknown	OUI							
337	sgn_U222677	Glyco_transf_8	Glycosyl transferase, family 8	carbohydrate biosynthesis (GO:0016051)	transferase activity, transferring hexosyl groups (GO:0016758)		Metabolism	OUI				OUI			
338	sgn_U222692						Metabolism	OUI	AT3G48000.1				OUI		
339	sgn_U222731	PPR	Pentatricopeptide repeat				RNA Processing	OUI	AT3G13160.1				OUI		
340	sgn_U222760						Unknown	OUI							
341	sgn_U222759						Unclassified Protein	OUI	AT2G43780.1						
342	sgn_U222856	SNARE	Target SNARE coiled-coil region				Unknown	OUI							
343	sgn_U222867						Unclassified Protein	OUI			OUI				
344	sgn_U222939	Ribosomal_L13	Ribosomal protein L13	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622), ribosome (GO:0005840)	Protein Synthesis	OUI				OUI			
345	sgn_U223038	GCV_H	Glycine cleavage H-protein	glycine catabolism (GO:0006546)		glycine cleavage complex (GO:0005960)	Metabolism	OUI	AT2G35120.1				OUI	OUI	OUI
346	sgn_U223115						Unclassified Protein	OUI					OUI		
347	sgn_U223117	PPR	Pentatricopeptide repeat				RNA Processing Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT3G13160.1		OUI				
348	sgn_U223220	Pkinase	Protein kinase	protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	protein kinase activity (GO:0004672), ATP binding (GO:0005524)			OUI	AT1G69220.1				OUI		

349	sgn_U223235	NDUF_B7	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit	electron transport (GO:0006118)	NADH dehydrogenase activity (GO:0003954), NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)	mitochondrion (GO:0005739)	Energy	OUI	AT2G02050.1				
350	sgn_U223295							OUI					
351	sgn_U223312						Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT3G59820.1				
352	sgn_U223398						Protein Fate	OUI	AT3G13860.1		OUI	OUI	
353	sgn_U223464	DUF598	Protein of unknown function DUF598				Unclassified Protein	OUI			OUI		
354	sgn_U223600						Metabolism	OUI	AT3G07480.1		OUI	OUI	
355	sgn_U223754						Unclassified Protein	OUI				OUI	
356	sgn_U223993						Energy	OUI	AT4G05020.1				
357	sgn_U224011	ELFV_dehydrog_N	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, dimerisation region	amino acid metabolism (GO:0006520)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT5G07440.1			OUI	OUI
358	sgn_U224048						Unclassified Protein	OUI			OUI		
359	sgn_U224045	IQ	IQ calmodulin-binding region				Unclassified Protein	OUI			OUI		
360	sgn_U224122						Unknown	OUI					
361	sgn_U224137						Unknown	OUI					
362	sgn_U224138						Unknown	OUI					
363	sgn_U224228	Rhodanese	Rhodanese-like				Defence Stress and Detoxification	OUI	AT1G79230.1		OUI		
364	sgn_U224310						Unclassified Protein	OUI	AT5G08060.1				
365	sgn_U224322	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)	mitochondrial inner membrane protein insertion complex (GO:0042721)	Protein Synthesis	OUI	AT5G61030.1		OUI		

366	sgn_U224371	zf-Tim10_DDP	Zinc finger, Tim10/DDP-type	protein-mitochondrial targeting (GO:0006626), mitochondrial inner membrane protein import (GO:0045039)			Protein Fate	OUI	AT1G61570.1				
367	sgn_U224444	Pkinase	Protein kinase	protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	protein kinase activity (GO:0004672), ATP binding (GO:0005524)		Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT3G18040.1			OUI	
368	sgn_U224716	ABC_tran	ABC transporter related		ATP binding (GO:0005524), ATPase activity (GO:0016887)		Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G58270.1		OUI	OUI	
369	sgn_U224714	FAD_binding_4	FAD linked oxidase, N-terminal	electron transport (GO:0006118)			Unknown	OUI					
370	sgn_U224775						Unclassified Protein	OUI	AT2G21640.1				
371	sgn_U224887						Unclassified Protein	OUI			OUI		OUI
372	sgn_U224898	Ribosomal_L22	Ribosomal protein L22/L17	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622)	Protein Synthesis	OUI			OUI	OUI	OUI
373	sgn_U225181	Ribosomal_L11_N	Ribosomal protein L11	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622)	Protein Synthesis	OUI			OUI	OUI	OUI
374	sgn_U225426						Unclassified Protein	OUI			OUI		
375	sgn_U225567						Metabolism	OUI	AT5G65720.1		OUI		
376	sgn_U225620						Metabolism	OUI	AT1G47260.1		OUI	OUI	
377	sgn_U225643	Ribosomal_L15	Ribosomal protein L15	protein biosynthesis (GO:0006412)	structural constituent of ribosome (GO:0003735)	intracellular (GO:0005622)	Protein Synthesis	OUI			OUI		
378	sgn_U225681						Unknown	OUI					
379	sgn_U225724						Unknown	OUI					
380	sgn_U225790						Unknown	OUI					
381	sgn_U225940	ATP-synt_G	Mitochondrial ATP synthase g subunit	ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933)	proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	Energy	OUI			OUI		OUI
382	sgn_U226038	GST_N	Glutathione S-transferase, N-terminal				Defence Stress and Detoxification	OUI	AT1G02940.1		OUI		

383	sgn_U226105					RNA Processing	OUI	AT4G36680.1		
384	sgn_U226594					Unknown	OUI			
385	sgn_U226666	Acyl-CoA_dh_1	Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity (GO:0016491)	Metabolism	OUI	AT3G45300.1		OUI
386	sgn_U226680	FAD_binding_2	Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein, N-terminal	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity (GO:0016491)	Energy	OUI	AT5G66760.1		OUI OUI
387	sgn_U226764	Branch	Glycosyl transferase, family 14		acetylglucosaminyltransferase activity (GO:0008375)	membrane (GO:0016020)	Metabolism	OUI		OUI
388	sgn_U226898	Ldh_1_C	Lactate/malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism (GO:0006100)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Energy	OUI	AT1G53240.1	
389	sgn_U227073	NAM	No apical meristem (NAM) protein				Unclassified Protein	OUI		OUI OUI
390	sgn_U227108	HATPase_c	ATP-binding region, ATPase-like		ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI		OUI OUI
391	sgn_U227220						Unclassified Protein	OUI		OUI
392	sgn_U227265	Peptidase_M41	Peptidase M41	proteolysis and peptidolysis (GO:0006508)	metalloendopeptidase activity (GO:0004222), ATP binding (GO:0005524)		Protein Fate	OUI	AT2G29080.1	OUI OUI
393	sgn_U227410						Energy	OUI	AT4G16450.1	
394	sgn_U227471						Unclassified Protein	OUI		OUI OUI
395	sgn_U227643						Unknown	OUI		
396	sgn_U227736	Transket_pyr	Transketolase, central region				Energy	OUI	AT3G55410.1	OUI
397	sgn_U227800						Unknown	OUI		
398	sgn_U227821	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)		Protein Synthesis	OUI	AT5G61030.1	OUI
399	sgn_U228020						Unclassified Protein	OUI		OUI OUI

400	sgn_U228100	Hexokinase_2	Hexokinase	glycolysis (GO:0006096)	hexokinase activity (GO:0004396), ATP binding (GO:0005524)		Energy	OUI	AT4G29130.1		
401	sgn_U228101						Unclassified Protein	OUI			OUI
402	sgn_U228318	NAD_binding_2	6-phosphogluconate dehydrogenase, NAD-binding	pentose-phosphate shunt (GO:0006098)	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity (GO:0004616)		Metabolism	OUI		OUI	OUI
403	sgn_U228310						Unclassified Protein	OUI		OUI	
404	sgn_U228445	Suc_Fer-like	Sucraseferredoxin-like				Unclassified Protein	OUI		OUI	
405	sgn_U228466	PPR	Pentatricopeptide repeat				RNA Processing Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT3G13160.1	OUI	OUI
406	sgn_U228514	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)		OUI	AT3G08580.1		OUI
407	sgn_U228680						Energy	OUI	AT4G00570.1		
408	sgn_U228883	_					Unknown	OUI			
409	sgn_U229126						Unclassified Protein	OUI		OUI	
410	sgn_U229337						Unknown	OUI			
411	sgn_U229440						Unclassified Protein	OUI	AT2G45060.1		
412	sgn_U229644						Unclassified Protein	OUI		OUI	
413	sgn_U229658	RRM_1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)		nucleic acid binding (GO:0003676)		Protein Synthesis	OUI	AT5G61030.1	OUI	
414	sgn_U229802						Unclassified Protein	OUI	AT5G08060.1		
415	sgn_U229935	Myb_DNA-binding	Myb, DNA-binding		DNA binding (GO:0003677)	nucleus (GO:0005634)	Unknown	OUI			
416	sgn_U230033	ELFV_dehydrog	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, C terminal	amino acid metabolism (GO:0006520)	oxidoreductase activity (GO:0016491)		Metabolism	OUI	AT5G07440.1		OUI

417	sgn_U230102	SWIB	SWIB/MDM2		nucleus (GO:0005634)	Unknown	OUI							
418	sgn_U230147	Ldh_1_N	Lactate/malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism (GO:0006100)	oxidoreductase activity (GO:0016491)	Energy	OUI	AT3G15020.1		OUI				
419	sgn_U230170					Unknown	OUI							
420	sgn_U230218	Lyase_1	Fumarate lyase		catalytic activity (GO:0003824)	Energy Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT2G47510.1		OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
421	sgn_U230230						OUI	AT1G74360.1						
422	sgn_U230243					Unknown	OUI							
423	sgn_U230288	SET	Nuclear protein SET			Unknown	OUI			OUI				
424	sgn_U230411					Protein Fate Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT3G23990.1		OUI	OUI			
425	sgn_U230482	KOW	KOW				OUI	AT4G28390.1		OUI				
426	sgn_U230962					Unknown	OUI							
427	sgn_U231046					Unknown	OUI							
428	sgn_U231108					Unknown	OUI							
429	sgn_U231228					Unknown	OUI							
430	sgn_U231798	Complex1_LYR	Complex 1 LYR protein	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH (GO:0016651)	Energy Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI			OUI				
431	sgn_U231867	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)			OUI						OUI	
432	sgn_U235544					Metabolism	OUI	AT3G45770.1						
433	sgn_U235895	SSB	Single-strand binding protein/Primosomal replication protein n		single-stranded DNA binding (GO:0003697)	Unclassified Protein	OUI			OUI	OUI			
434	sgn_U235945					Unknown	OUI							

453	sgn_U240008	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT5G13490.1	OUI	OUI		
454	sgn_U240037						Energy	OUI	AT4G05020.1	OUI			
455	sgn_U240176						Unknown	OUI					
456	sgn_U240514	EXS	EXS, C-terminal			integral to membrane (GO:0016021)	Unclassified Protein	OUI			OUI	OUI	
457	sgn_U240614						Unknown	OUI					
458	sgn_U240821						Energy	OUI	AT3G55410.1		OUI	OUI	OUI

459	sgn_U240958	SCO1-SenC	Electron transport protein SCO1/SenC	electron transport (GO:0006118)			Energy	OUI		OUI	OUI				N
460	sgn_U241114	Hexokinase_1	Hexokinase	glycolysis (GO:0006096)	hexokinase activity (GO:0004396), ATP binding (GO:0005524)		Energy	OUI	AT4G29130.1						N
461	sgn_U241174						Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI							N
462	sgn_U241407	Mito_carr	Mitochondrial substrate carrier	transport (GO:0006810)	binding (GO:0005488)	membrane (GO:0016020)	Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT4G28390.1		OUI				N
463	sgn_U241481	Malic_M	Malic enzyme, NAD-binding				Energy	OUI	AT4G00570.1						N
464	sgn_U241669	Transketolase_C	Transketolase, C-terminal				Energy	OUI	AT5G50850.1		OUI				N
465	sgn_U241673						Unknown	OUI							N
466	sgn_U241867						Unclassified Protein	OUI				OUI			N
467	sgn_U241915						Energy	OUI	AT3G55410.1		OUI				
468	sgn_U242628	Malic_M	Malic enzyme, NAD-binding				Energy	OUI	AT2G13560.1						
469	sgn_U242810	malic	Malic enzyme, N-terminal				Energy	OUI	AT4G00570.1						
470	sgn_U242893						Unclassified Protein	OUI				OUI			
471	sgn_U232013	HSP90	Heat shock protein Hsp90	protein folding (GO:0006457)	unfolded protein binding (GO:0051082)		Protein Fate	OUI	AT4G24190.1			OUI			
472	sgn_U232543	Cytochrom_C1	Cytochrome c1	electron transport (GO:0006118)	electron transporter activity (GO:0005489)	mitochondrial electron transport chain (GO:0005746)	Energy	OUI	AT3G27240.1		OUI	OUI			
473	sgn_U232751						Energy Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI	AT2G33040.1			OUI	OUI	OUI	
474	sgn_U232748	Clat_adaptor_s	Clathrin adaptor complex, small chain	intracellular protein transport (GO:0006886)		clathrin vesicle coat (GO:0030125)	Unknown Cellular Transport and Transport Mechanisms	OUI			OUI		OUI		
475	sgn_U232779						Unclassified Protein	OUI			OUI				
476	sgn_U232969						Energy	OUI	AT5G13450.1			OUI			

477	sgn_U232985					Unknown	OUI					
478	sgn_U233068					Unclassified Protein	OUI		OUI			
479	sgn_U233230					Metabolism	OUI	AT2G38670.1	OUI			
480	sgn_U233939					Unknown	OUI					
481	sgn_U234123					Unclassified Protein	OUI		OUI			
482	sgn_U234143					Unknown	OUI					
483	sgn_U234236	Calreticulin	Calreticulin/calnexin		calcium ion binding (GO:0005509)	Unknown Cellular Communication / Signal Transduction	OUI	AT1G09210.1				
484	sgn_U234357					Energy	OUI	AT3G10860.1				
485	sgn_U234462					Energy	OUI	AT5G65750.1	OUI			
486	sgn_U234919					Protein Fate	OUI	AT3G13860.1	OUI	OUI		
487	sgn_U234950					Unclassified Protein	OUI					
488	sgn_U234965	HMG_box	HMG1/2 (high mobility group) box	regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	DNA binding (GO:0003677)	Unknown	OUI					
489	sgn_U235106					Unknown	OUI					
490	sgn_U235124					Unknown	OUI					
491	sgn_U235152					Unclassified Protein	OUI		OUI			
492	sgn_U235154					Unknown	OUI					
493	sgn_U235162	Complex1_LYR	Complex 1 LYR protein	electron transport (GO:0006118)	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH (GO:0016651)	mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	Energy	OUI		OUI	OUI	OUI