Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage et séquençage d'un fragment d'ADNc d'une protéine b-ZIP végétale homologue à Creb

Bellefontaine, Flore

Award date:
1995

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

CLONAGE ET SÉQUENÇAGE D'UN FRAGMENT D'ADNc D'UNE PROTÉINE b-ZIP VÉGÉTALE HOMOLOGUE À CREB.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par
BELLEFONTAINE Flore.
Décembre 1995.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Clonage et séquençage d'un fragment d'ADNc d'une protéine b-Zip végétale homologue à CREB.

BELLEFONTAINE Flore

Résumé

L'existence d'une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les plantes n'est encore qu'hypothétique. Cependant, des intermédiaires protéiques potentiels de cette voie ont déjà été identifiés chez plusieurs espèces végétales.

Au cours de ce travail, l'amplification par PCR d'une population d'ADNc de chicorée (*Cichorium intybus*) a permis de cloner deux fragments (F5-6 et F'5-6) de tailles respectives de 540 pb et d'environ 500 pb. F5-6 et F'5-6 codent chacun pour un domaine b-Zip, région riche en résidus basiques suivie d'un motif particulier appelé leucine-zipper. Ce domaine b-Zip est caractéristique d'une famille de facteurs de transcription et sert à la liaison à l'ADN et à la dimérisation.

Le domaine b-Zip des protéines CiBP1 et CiBP2 dont nous avons cloné un fragment présente une grande similarité de séquence avec CREB, un activateur de transcription mammalien dépendant de l'AMPc. Des comparaisons de séquences avec des protéines b-Zip d'autres espèces végétales montrent que CiBP1 et CiBP2 appartiendraient à une famille de facteurs de transcription se liant préférentiellement à un élément de séquence très proche du CRE, élément central des promoteurs dépendants de l'AMPc chez les animaux.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Décembre 1995
Promoteur : P. VAN CUTSEM.

Au terme de ce travail, je tiens tout particulièrement à remercier le professeur P. Van Cutsem de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur aide technique, leurs conseils et leurs encouragements tout au long de ces dix mois: Johan, Jean-Pierre, Sonia, André, Pierre, Laurence, Dominique.

Merci à Carl, qui a été le compagnon d'une longue aventure; merci à Isabelle G., Natacha, Luis, Véro, Isa D., Damien qui ont rythmé la vie de cette année particulière; merci à tous ceux et celles qui m'ont fourni un soutien logistique lors de l'ultime étape, je pense tout particulièrement à Mumu, Catherine, Phil, Xavier, Nathalie.

Merci aux très nombreuses autres personnes qui ont su créer tout au long de ces cinq années les moments de détente sans lesquels rien n'est possible, Rama, Florence, Lulu, mes parents, mes grands-parents, Bonne-Maman, Jacques et Pia, et tous les autres.

Je ne sais pas quels mots utiliser pour te dire, Jyp, que sans toi, tout cela n'aurait pas pu voir le jour et j'espère que tu oublieras rapidement les nombreuses nuits blanches que tu as consacrées à la ponte d'un travail qui a mis le temps à voir le jour.

ABREVIATIONS

A	Adénosine
a a	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire à un ARNm
Amp	Ampicilline
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Amp^r	Marqueur de résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adénosine triphosphate.
C	Cytidine
CAP	cAMP catabolite gal activator protein
CAT	chloramphenicol acétyl transférase
CBP	CREB binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
CTX	Toxine du choléra
DAG	1-2- Diacyl glycérol
DO	Densité optique
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
EREBP	Ethylene response element binding protein
G	Guanosine
GSK	Glycogène synthase kinase II
GSP	gene specific primer
GTP	Guanosine triphosphate
IBMX	3-isobutyl - 1 - méthylxanthine
IPTG	Isopropyl, ß-D thiogalactopyranoside
JIP	Jasmonic acid induced protein
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LB	Milieu de Luria-Bertani
M	Molaire
MCS	Site multiple de clonage ("Multiple Cloning Site")
N	A, C, G, T
ORF	Phase ouverte de lecture ("Open Reading Frame")
PAL	Phénalanine ammonia-lyase
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne ("Polymerase Chain Reaction")
PIP2	Phopsphatidylinositol 4-5 biphosphate
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc.
PKC	Protein kinase dépendante de la voie des phosphoinositides
PM	Poids Moléculaire
PR	pathogenesis related
PTX	Toxine pertussique
RACE	Rapid Amplification of 5' and 3' cDNA Ends
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G.
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
SABP	Salicylic acid binding protein
SAR	Systemic aquired resistance
T	Thymidine
TAF	TBP associatef factors
TBP	TATA binding protein
TMV	virus de la mosaïque du tabac
Tris	Tri-(hydoxyméthyl)-aminométhane
U	Uridine
UV	Ultra-Violet
V	Volt
X-gal	5-Bromo 4-Chloro 3-indoyl, ß-D galactopyranoside

Table des matières.

CHAPITRE 1 . INTRODUCTION 5

I) Introduction générale. 5

II) La voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les animaux. 6

A) La transduction du signal. 6

B) L'AMPc, une molécule régulatrice fondamentale. 7

C) La régulation de la transcription dépendante de l'AMPc. 8

1.- Aperçu général de la voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc. 8

2.- Les acteurs de cette voie. 8

a) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). 8

b) Les protéines G hétérotrimériques. 9

c) L'adénylate cyclase (AC). 9

d) La Protéine Kinase dépendante de l'AMPc (PKA). 10

e) Les facteurs de transcription dépendants de l'AMPc 11

1) Le cAMP-response element (CRE). 11

2) Les protéines qui lient le CRE (CRE-binding proteins). 12

i) Introduction. 12

ii) CREB, activateur transcriptionnel dépendant de l'AMPc. 13

iii) L'hétérodimérisation et l'épissage alternatif sont deux caractéristiques des CRE-Binding protéines. 16

iv) Les répresseurs de la transcription AMPc-dépendante 18

III) Indices de l'existence d'une voie de Transduction du Signal dépendante de l'AMPc chez les Plantes. 19

A) Aperçu général de la transduction du signal chez les plantes. 19

1.- Voie des phosphoinositides et du calcium. 19

2.- Acide salicylique , catalase, H_2O_2 et dérivés actifs de l'oxygène. 21

3.- La voie de l'acide jasmonique et de ses analogues. 22

4.- L'éthylène active des facteurs de transcription qui interagissent avec un "Ethylene -Responsive Element". 23

B) L'AMPc comme messager secondaire chez les Plantes. 23

C) Les intermédiaires hypothétiques d'une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les Plantes. 25

1.- Protéines G végétales (Verhey & Lomax, 1993). 25

2.- Mise en évidence d'une activité adénylate cyclase et d'une activité phosphodiestérase. 26

3.- Y a-t-il des équivalents à la PKA chez les cellules végétales? 26

4.- Identification de facteurs de transcription végétaux homologues à la famille CREB/ATF. 27

CHAPITRE 2 . OBJECTIFS 29

CHAPITRE 3 . RESULTATS ET DISCUSSIONS. 30

I) Tentative de clonage chez *Arabidopsis thaliana*. 30

A) Germination et culture *in vitro* de graines d'*Arabidopsis thaliana*. 30

B) Extraction d'ARN total. 30

1.- Broyage des cellules. 30

2.- Extraction au chlorure de lithium. 30

3.- Extraction au chlorure de litihum suivi par un gradient au chlorure de césium. 31

4.- Extraction au TRIzol™ Reagent. 31

C) Purification des ARN messagers. 32

D) Conclusion. 33

II) Clonage d'une b-Zip protéine homologue à CREB chez *Cichorium intybus*. 33

A) Introduction. 33

B) L'ADNc de chicorée. 33

C) Amplification par 5'- et 3'-RACE PCR (Rapid Amplification of 5'- and 3'-cDNA Ends). 34

1.- Principe de la méthode. 34

2.- Choix des Gene Specific Primers (GSP's). 34

3.- Résultats des réactions de 5'- et 3'-RACE. 35

a) Mise au point des conditions d'amplification. 35

b) Résultats obtenus avec une concentration en GSP de 2 µM. 36

c) Origine des bandes multiples. 36

D) Contrôles des amplifications avec Zip5 et Zip6. 37

E) Clonage du fragment F5-6 dans pSPORT1. 38

1.- Restriction, ligation et transformation (figure 28). 38

2.- Analyse des recombinants. 39

F) Séquençage et analyse des séquences obtenues. 39

1.- Séquençage du clone plasmidique n°2. 40

2.- Séquençage du clone plasmidique n°3. 41

3.- Comparaison de F5-6 et de F'5-6. 41

4.- Recherche dans les banques de données. 42

5.- Alignements multiples entre F5-6, d'autres b-Zip protéines végétales et CREB. 43

CHAPITRE 4 . CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES. 45

CHAPITRE 5 . MATERIEL ET METHODES. 48

I) Matériel. 48

A) Tampons et solutions. 48

1.- Pour l'ADN. 48

2.- Pour l'ARN. 49

B) Milieux utilisés. 49

C) Souche bactérienne utilisée: E.Coli XL1-Blue. 50

D) Plasmides. 50

E) Antibiotiques. 50

F) Enzymes. 51

II) Culture *in vitro* de plantules d'*Arabidopsis thaliana*. 51

III) Techniques génétiques. 52

A) Manipulations courantes. 52

1.- Préparation de cellules électrocompétentes. 52

2.- Transformation de bactéries par électroporation. 53

3.- Sélection des transformants et des recombinants. 54

4.- Préparation d'ADN plasmidique (miniprep). 55

5.- Extraction au phénol. 56

6.- Précipitation à l'éthanol. 57

7.- Restriction d'ADN purifié. 57

8.- Ligation. 58

9.- Dosage des acides nucléiques. 58

a) Dosage de l'ARN au spectrophotomètre. 58

b) Dosage de l'ADN plasmidique par fluorimétrie. 59

10.- Electrophorèse en gel d'agarose. 60

11.- Récupération de bande d'ADN sur gel d'agarose. 60

B) Construction d'une banque d'ADNc. 61

1.- Extraction d'ARN total. 61

a) Broyage des explants d'*A. thaliana*. 61

b) Extraction au chlorure de lithium. 61

c) Elimination des polysaccharides par précipitation à l'éthanol. 62

d) Elimination des polysaccharides dans un gradient de CsCl. 63

e) Extraction d'ARN total au Trizol Reagent 64

2.- Purification d'ARN messager. 64

C) Amplification par PCR. 66

1.- Principe. 66

2.- Protocole-type. 66

3.- Rapid Amplification of 5'- and 3'-cDNA Ends (5'- et 3'-RACE). 67
D) Séquençage. 68
1.- Réaction de séquençage. 68
2.- Electophorèse en gel de polyacrylamide. 69
a) Préparation des plaques. 69
b) Préparation du gel. 69
c) Migration des échantillons. 70
3.- Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon. 70
4.- Fixation de l'ADN sur la membrane. 71
5.- Détection et autoradiographie. 71
E) Comparaison de séquences. 72

Chapitre 1. INTRODUCTION

I) Introduction générale.

Au cours de son existence, une plante est exposée à toutes sortes de stimuli provenant de son environnement. En plus des stress dûs au climat (vent, sécheresse, froid,...), la plante subit de multiples agressions de la part de pathogènes (champignons, bactéries, insectes et virus).

Pour faire face à ces différents types d'agressions, les végétaux ont développé une série de réponses de défense qui nécessitent d'abord la détection du pathogène et ensuite le déclenchement d'événements moléculaires aboutissant finalement à l'activation d'enzymes et de gènes de défense. On a ainsi pu déterminer que la dégradation de la paroi végétale par des enzymes pectolytiques produites par un pathogène libérait des fragments pectiques interprétés par la cellule végétale comme un signal d'agression. Pratiquement, on peut simuler une attaque pathogène et provoquer l'induction de mécanismes de défense chez la cellule végétale à l'aide de toute une panoplie de molécules, provenant de la paroi du pathogène ou libérées de la propre paroi du végétal. On a rassemblé toutes ces molécules sous le terme générique d'éliciteurs.

Au laboratoire de Biotechnologie Végétale, nous tentons d'identifier certaines voies de transduction du signal et leurs intermédiaires qui, lors d'une interaction hôte-pathogène, permettent l'expression de gènes de défense. Un des buts de l'étude de la transduction du signal chez les cellules végétales réside dans l'application de ces nouvelles connaissances à la biotechnologie, en vue de créer des espèces transgéniques disposant de mécanismes plus efficaces de résistance aux attaques de pathogènes.

Au cours de sa thèse de doctorat, Johan Messiaen (1994) a émis l'hypothèse que l'AMPc pouvait participer à la transduction du signal pectique en permettant la phosphorylation activatrice de la PAL (phénylalanine ammonia-lyase), une enzyme impliquée dans la synthèse des phénylpropanoïdes.

Les phénylpropanoïdes sont les précurseurs des phytoalexines (antibiotiques végétaux synthétisés en réponse à une attaque pathogène) et de la lignine (qui constitue une barrière physique contre l'agression du pathogène). Au cours de notre travail nous avons tenté de mettre en évidence chez une espèce végétale étudiée au laboratoire un facteur de transcription homologue à la famille de facteurs de transcription CREB/ATF (**c**AMP **R**esponsive **E**lement **B**inding protein/**A**ctivating **T**ranscription **F**actor). Cette recherche s'insère dans le cadre de l'élucidation des différents partenaires d'une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les végétaux.

Dans la suite de cette introduction, nous commencerons par donner un large aperçu de la voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les animaux et plus particulièrement son intervention dans la régulation de l'expression des gènes. Ensuite nous détaillerons l'état d'avancement des recherches quant à l'existence d'une telle voie chez les cellules végétales.

II) La voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les animaux.

A) La transduction du signal.

Chaque cellule isolée ou appartenant à un organisme multicellulaire est soumise à des informations extérieures qu'elle commence par percevoir et auxquelles elle va ensuite répondre. Chez les animaux, la communication intercellulaire dépend en majorité du système neuro-endocrinien. Le système nerveux central transmet des signaux électriques le long des neurones. Ces signaux électriques sont ensuite modifiés en messagers chimiques (**hormone**) au niveau du système endocrinien. Les hormones, ou **messagers primaires**, ne pénètrent en général pas dans la cellule. La transmission du message hormonal à travers la membrane cytoplasmique se fait par le biais d'un récepteur membranaire. Activé par l'hormone, ce récepteur entraîne la libération d'un **messager secondaire** relayant les signaux hormonaux à l'intérieur de la cellule. Le messager secondaire en activant des effecteurs cellulaires pemet la réponse de la cellule à son environnement. La transmission du message hormonal à travers la barrière que constitue la membrane cellulaire est appelée **transduction du signal.**

Les messagers secondaires les plus importants chez les cellules animales sont l'AMPc (3',5'-adénosine monophosphate cyclique), l'ion calcium et les molécules dérivées du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2), qui constitue 2 à 8 % des lipides membranaires. Le PIP_2 peut être clivé en deux messagers secondaires, l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et le 1,2-diacylglycérol (DAG). Le DAG contient

un groupement arachidonyle, un acide gras polyinsaturé qui sert de précurseur à toute une classe d'effecteurs cellulaires, à savoir les prostaglandines et les leucotriènes (Rawn, 1990).
Dans la suite de ce travail, nous nous consacrerons plus particulièrement à la voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc.

B) L'AMPc, une molécule régulatrice fondamentale.

L'AMPc est une molécule ubiquiste à l'origine de nombreux processus biochimiques et physiologiques chez les cellules animales (Roesler *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1993). Comme **messager secondaire** intracellulaire, l'AMPc permet de transmettre et d'amplifier un signal hormonal extracellulaire et de le traduire en réponse cellulaire.
L'AMPc, en activant une protéine kinase (PKA), va pouvoir intervenir dans des processus aussi différents que la dégradation du glycogène dans le foie, la transmission synaptique, la régulation de certains canaux ioniques, la synthèse des protéines et des acides gras ainsi que la régulation de la transcription de toute une série de gènes. C'est à ce dernier phénomène que nous allons plus particulièrement nous intéresser (Roesler *et al.*, 1988; Rawn, 1990; Choi *et al.*, 1993).

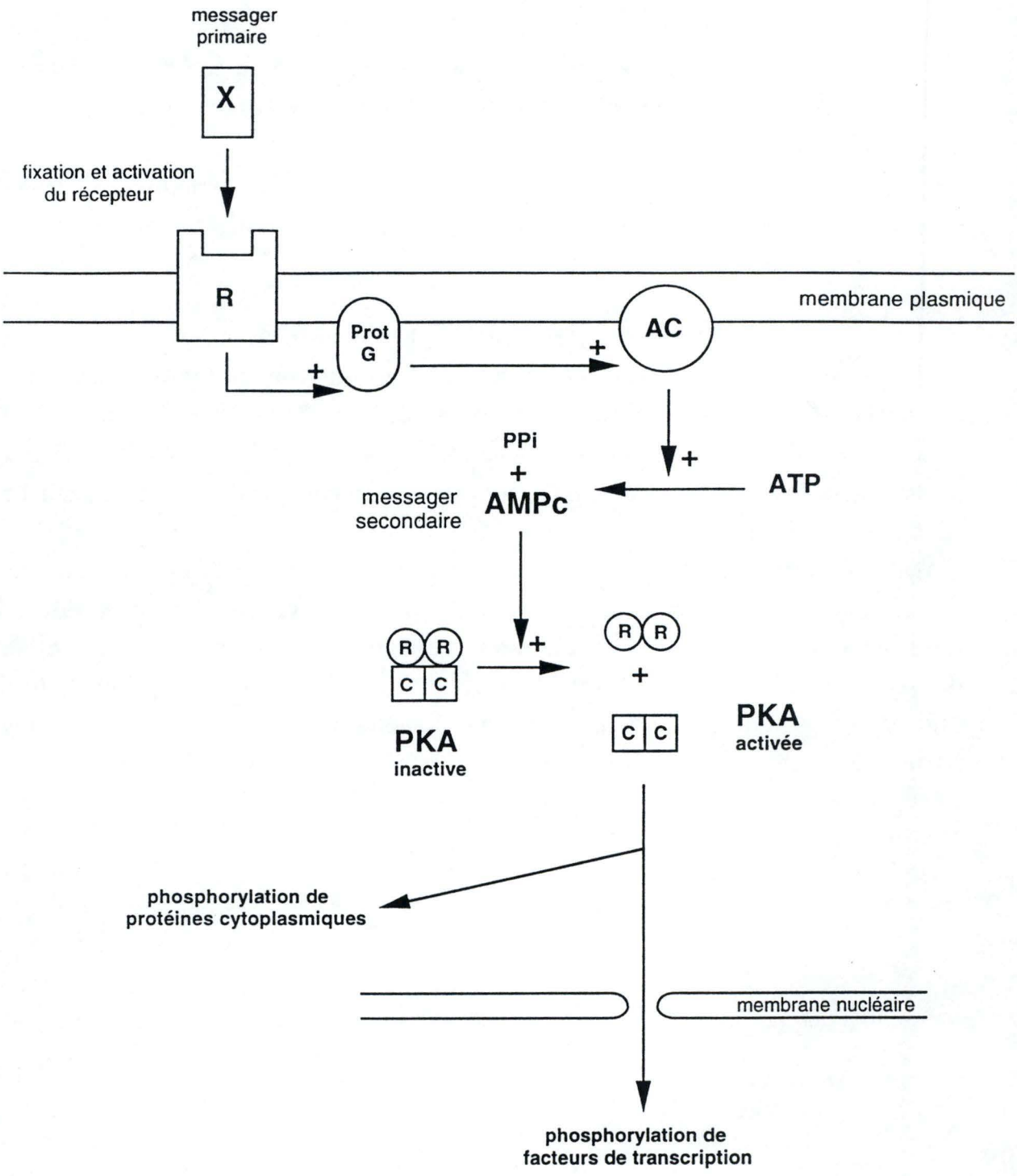


Figure 1: Schéma de la voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les cellules animales.

C) La régulation de la transcription dépendante de l'AMPc.

1.- Aperçu général de la voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc.

La liaison d'un **messager primaire** (hormone, facteur de croissance, neurotransmetteur[1]) à son **récepteur** induit chez lui une modification conformationnelle responsable de l'activation d'une **protéine G** qui lui est associée. Cette protéine G active à son tour l' **adénylate cyclase**. Cette enzyme provoquera l'augmentation du taux d' **AMPc** intracellulaire en catalysant la réaction ATP → AMPc + pyrophosphate.

L'AMPc active ensuite la **PKA** (protéine kinase dépendante de l'AMPc) en se liant coopérativement à deux sites sur la sous-unité régulatrice de la protéine, libérant ainsi la sous-unité catalytique qui, de son côté, pourra phosphoryler de nombreuses protéines cytoplasmiques ou nucléaires, parmi lesquelles des **facteurs de transcription** (Darnell *et al.*,1989; Rawn, 1990; Lee, 1991; Lalli & Sassone-Corsi, 1994) (figure 1).

2.- Les acteurs de cette voie.

a) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Très tôt, on s'est intéressé à la façon dont un signal extra-cellulaire pouvait être transmis à la cellule malgré la barrière que constitue la membrane cytoplasmique. Une partie de la réponse à cette question a été apportée par la découverte d'une famille de récepteurs membranaires, les RCPG. En 1993, une soixantaine de RCPG avaient déjà été clonés et séquencés. L'analyse fine de leur structure a permis d'établir qu'ils possédaient un domaine transmembranaire composé de sept hélices α contenant surtout des acides aminés hydrophobes. Ces sept hélices formeraient un sillon central, profond d'environ 20 Å et au fond duquel une poche hydrophobe constituerait le site de fixation du médiateur (figure 2 A). La fixation de celui-ci déclencherait une perturbation locale au niveau du réseau formé par les chaînes latérales des hélices α. Cette perturbation en se propageant de proche en proche depuis la face extracellulaire du récepteur jusqu'à sa face cytoplasmique permettrait le couplage à la protéine G. La construction de récepteurs chimériques a montré qu'une boucle intracellulaire (boucle 3) reliant les hélices 5 et 6 ainsi que la partie C-terminale étaient directement impliquées dans ce couplage (Hibert *et al.*, 1993) (figure 2 B). Le mastoparan, un peptide

[1]les molécules qui suivent activent la voie de l'AMPc: adrénaline, glucagon, ACTH, vasopressine, noradrénaline, FSH, LH, TSH, parathormone, insuline.

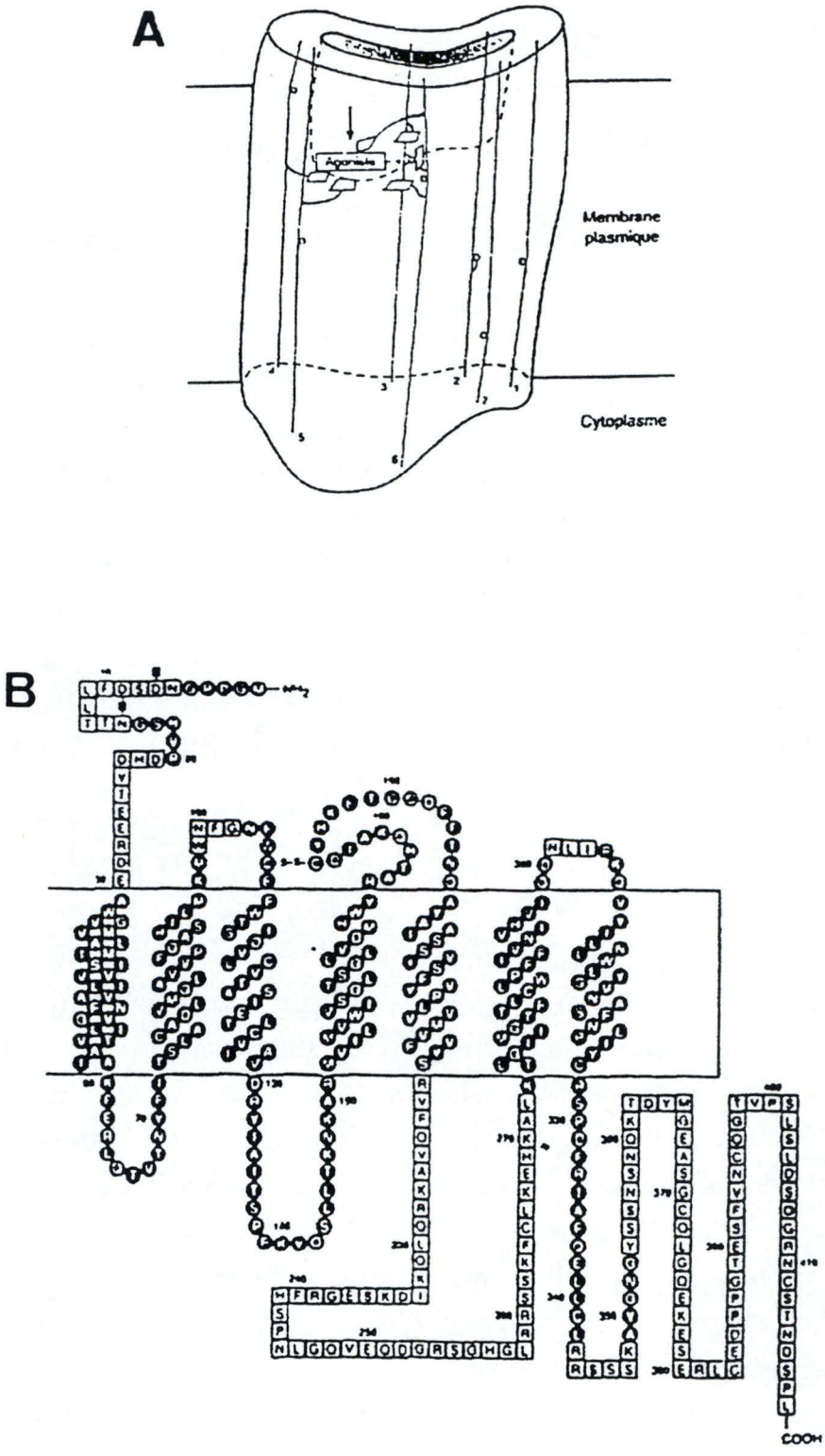


Figure 2: A. Représentation schématique d'un RCPG. Les sept hélices α transmembranaires définissent au sein de la protéine une cavité à l'intérieur de laquelle peut pénétrer l'agoniste.

B. Modèle bidimensionnel du récepteur β_2-adrénergique de hamster. La boucle intracellulaire n°3 (reliant les hélices 5 et 6) et la partie carboxy-terminale de la protéine sont directement impliquées dans le couplage avec les protéines G (Hibert *et al.*, 1993).

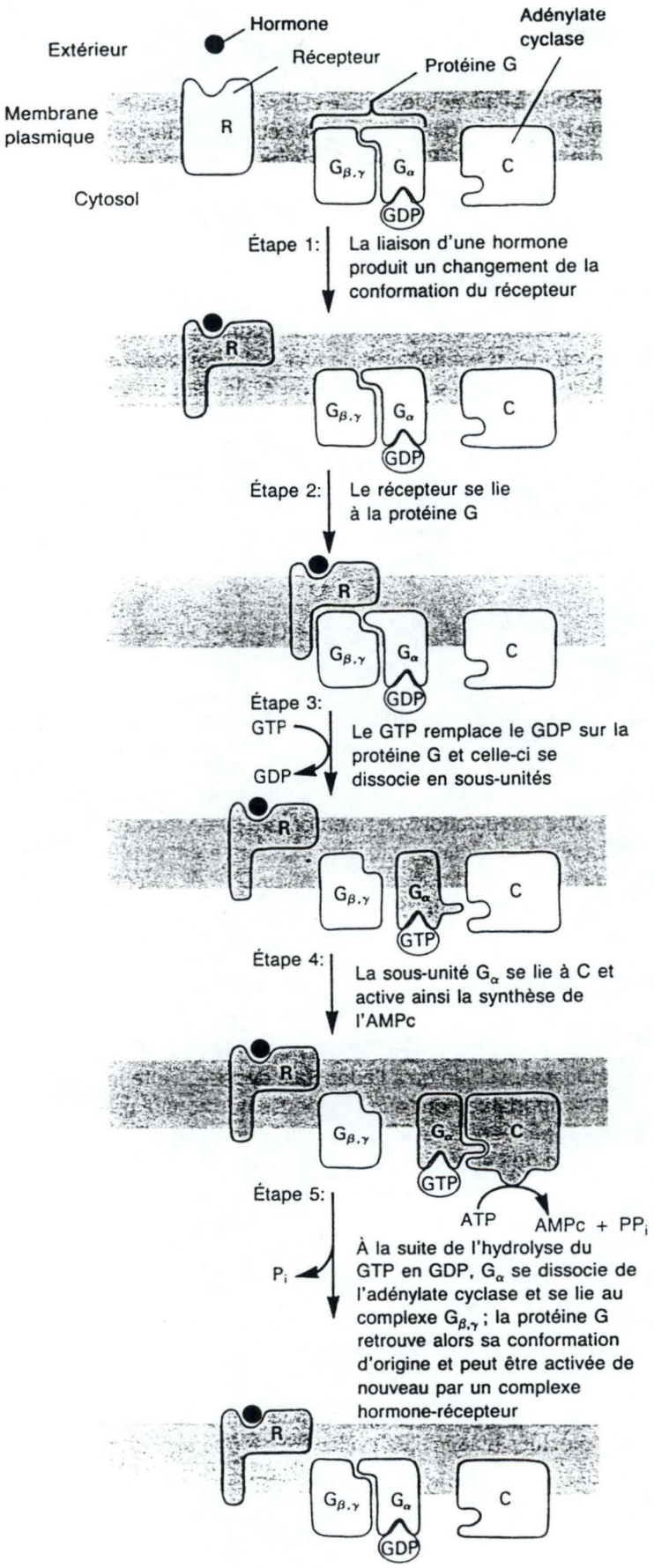
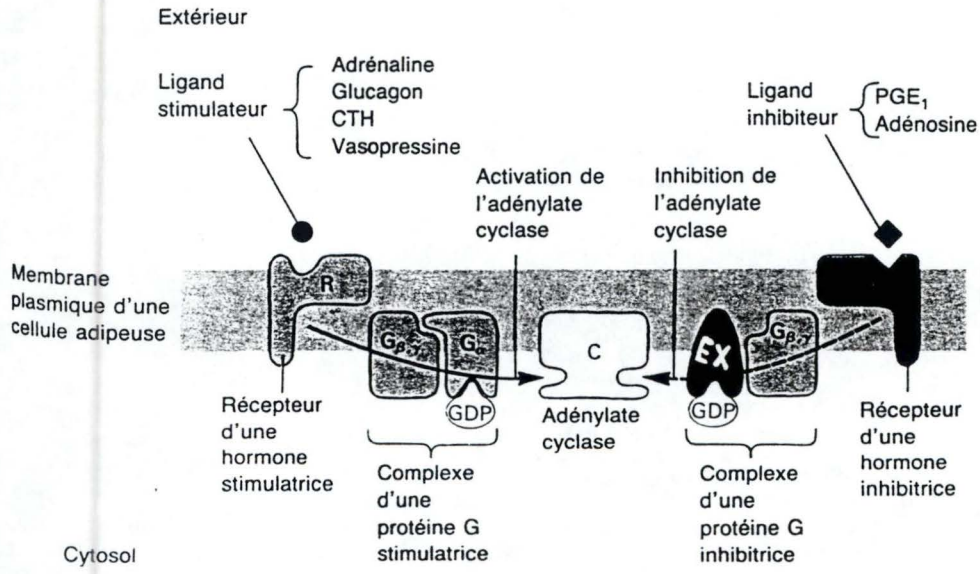


Figure 3: Voie d'activation de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire des protéines G activatrices (Darnell *et al.*, 1989).



Différentes protéines G servent d'intermédiaires dans l'activation et l'inhibition de l'adénylate cyclase. Comme illustré à la figure 16.9, plusieurs complexes hormone-récepteur se lient à la protéine G activatrice, provoquant le remplacement du GDP déjà fixé par le GTP et la dissociation de la sous-unité G_α·GTP. Cette dernière se lie à l'adénylate cyclase et l'active. Cependant, d'autres complexes hormone-récepteur se fixent à une sous-unité G_α inhibitrice différente, également constituée d'une sous-unité α liée à du GDP ou du GTP et des sous-unités β et γ. D'une façon encore inconnue, la protéine G inhibitrice est modifiée si bien qu'elle se fixe à l'adénylate cyclase et l'inhibe. Les protéines G activatrice et inhibitrice ont des sous-unités G_β et G_γ identiques, mais des sous-unités G_α distinctes. De plus, les récepteurs associés à ces deux types de protéines G diffèrent. *D'après A.G. Gilman, 1984,* Cell ***36:577.***

Figure 4: Représentation schématique de l'intervention de différentes protéines G dans l'activation et l'inhibition de l'adénylate cyclase (Darnell *et al.*, 1989).

extrait de venin de guêpe, active les protéines G car il simule la région du récepteur impliquée dans l'interaction moléculaire avec les protéines G (Berridge, 1993).

b) Les protéines G hétérotrimériques.

Il existe deux formes de protéines G: les "small G proteins" et les protéines G hétérotrimériques. Les "small G proteins", des polypeptides isolés d'environ 200 acides aminés, sont impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire, la sécrétion de protéines et les interactions entre vésicules intracellulaires (Simon *et al.*, 1991).

Les protéines G hétérotrimériques sont logées à la face interne de la membrane et sont composées de trois sous-unités (S.U. α, β et γ) parmi lesquelles de nombreuses isoformes ont été identifiées. Lors de la fixation du ligand sur son récepteur, le changement de conformation ainsi induit permet au récepteur de lier les S.U. β et γ de la protéine G tandis que la S.U. α lie le GTP et se dissocie des deux autres S.U. Grâce à la propriété de fluidité de la membrane, la S.U. α peut se fixer au niveau d'une enzyme membranaire, l'adénylate cyclase, et l'activer. Cet effet n'est que transitoire: la S.U. α possède une activité GTPase et va rapidement hydrolyser le GTP en GDP. Sous cette forme α-GDP inactive, elle se lie à nouveau aux S.U. β et γ qui, en retour, se dissocient du RCPG, ce qui provoque un relargage du ligand à la surface extracellulaire de la membrane (Darnell *et al.*, 1989) (figure3).

A côté de cette voie activatrice de l'adénylate cyclase, il existe une voie miroir qui s'effectue par l'intermédiaire de S.U. α inhibitrices (figure 4).

Signalons encore que les S.U. α des protéines G sont sensibles à l'ADP-ribosylation[2] par la toxine pertussique (PTX) et par la toxine du choléra (CTX). La PTX empêche les protéines G de se lier à leur récepteur, ce qui bloque la transduction du signal. La CTX active de manière irréversible les protéines G en inhibant l'activité GTPase des S.U. α, provoquant ainsi une activation continuelle de l'adénylate cyclase.

c) L'adénylate cyclase (AC).

L'adénylate cyclase est une enzyme membranaire qui catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP (figure 5). Le taux d'AMPc est strictement contrôlé dans la

---

[2]L'ADP-ribosylation consiste à transférer un groupe ADP-ribose provenant du NAD^+ sur un résidu arginine.

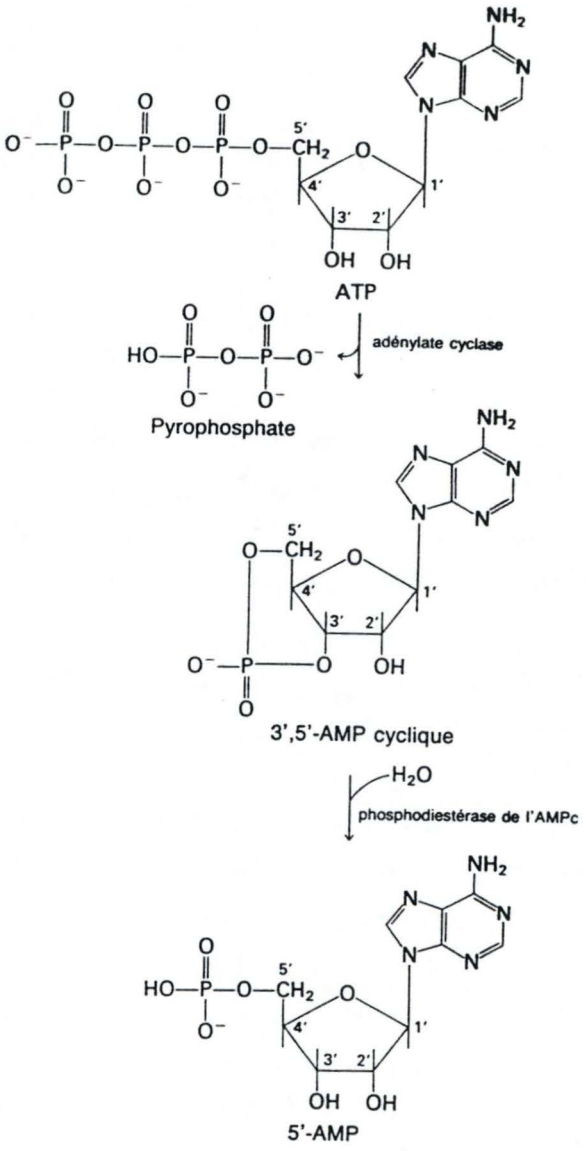


Figure 5: Synthèse et dégradation de l'AMPcyclique.

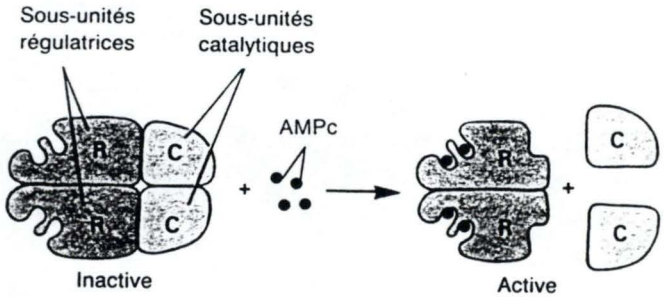


Figure 6: Structure tétramérique de la PKA. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices provoque la libération des sous-unités catalytiques actives (Darnell *et al.*, 1989).

cellule grâce à l'intervention d'une autre enzyme, l'AMPc-phosphodiestérase, qui catalyse l'hydrolyse de l'AMPc en AMP (figure 5) (Rawn, 1990).
A ce jour, au moins six AC différentes ont pu être caractérisées. Leurs séquences sont fortement conservées, malgré la présence de zones hypervariables qui les distinguent. Leur régulation est très complexe: on a découvert que les sous-unités β et γ des protéines G pouvaient y participer directement elles-aussi, ce qui vient compliquer le schéma classique où seule la sous-unité α était régulatrice (Tang & Gilman, 1991).
De plus, il a été démontré que certaines AC étaient sensibles à la calmoduline (Choi *et al.*, 1993). La calmoduline est une protéine cytoplasmique qui contrôle la plupart des fonctions régulatrices du calcium. Elle possède quatre domaines qui lient chacun un ion Ca^{2+}. Après avoir fixé le Ca^{2+} elle est capable de se lier à toute une série de protéines et de modifier leur activité enzymatique (Darnell *et al.*, 1989).
De ce qui précède nous pouvons donc conclure que la régulation de l'AC est un processus particulièrement complexe, ce qui nous indique l'importance donnée au contrôle du taux d'AMPc intracellulaire au cours de l'évolution.
Pour étudier les conséquences physiologiques de l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire, on traite classiquement les cellules à la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase.

d) La Protéine Kinase dépendante de l'AMPc (PKA).

La PKA est une holoenzyme tétramérique composée de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C) (figure 6). On a longtemps considéré qu'il n'existait que deux types de PKA, les isoenzymes de type I et II, ne variant que par leurs sous-unités, RI et RII (Constantinou *et al.*, 1985). En fait il en existe plus de deux: on a pu identifier au niveau de l'ARNm, quatre sous-unités régulatrices (RIα, RIβ, RIIα et RIIβ) et trois sous-unités catalytiques (Cα, Cβ et Cγ), ce qui permettrait de former des holoenzymes aux propriétés différentes (Lee, 1991).
Le mécanisme classiquement invoqué par lequel la PKA module l'activité de facteurs nucléaires implique la liaison de deux molécules d'AMPc sur chaque sous-unité R, ce qui provoquerait la libération des sous-unités C. Les sous-unités C ainsi activées pénètrent dans le noyau et y phosphorylent notamment des facteurs de transcription. De ce point de vue, les sous-unités R ne serviraient donc qu'à inhiber l'action des sous-unités C en l'absence d'AMPc (Boshart *et al.*, 1991) (figure 6).
Cependant une activité de topoisomérase a été mise en évidence pour la sous-unité RII de la PKA (Constantinou *et al.*,1985). Pour rappel, les topoisomérases

sont des enzymes qui modifient le degré de super-enroulement de l'ADN en réalisant des coupures simple-brin (topoisomérases de type I) ou double-brin (topoisomérases de type II). En modifiant la topologie de l'ADN, les topoisomérases rendent possibles des activités comme la réplication, la recombinaison et la transcription qui nécessitent que les deux brins d'ADN soient séparés (Lewin, 1990). La sous-unité RII de la PKA ne pourrait exercer son activité de topoisomérase qu'en présence d'AMPc et après avoir été phosphorylée par la sous-unité C. Elle pourrait alors former un complexe avec l'ADN (Constantinou *et al.*, 1985). Un autre argument en faveur d'une intervention directe de la sous-unité RII au niveau de l'ADN consiste dans l'homologie qui existe entre elle et la protéine procaryotique CAP (cAMP-catabolite gene activator protein) (Constantinou *et al.*, 1985; Roesler *et al.*, 1988).

Il a aussi été montré que la sous-unité RII de la PKA, au contraire de la sous-unité RI, était requise pour l'expression génétique AMPc-dépendante (Montminy *et al.*, 1986; Tortora & Cho-Chung, 1990). La transfection de cellules mutantes, insensibles à l'AMPc, par le gène de la sous-unité RII, inséré dans un vecteur d'expression, restaurait chez ces cellules, stimulées par la forskoline, la capacité d'induire l'expression AMPc-dépendante du gène de la somatostatine, un peptide hypothalamique (Tortora & Cho-Chung, 1990).

e) Les facteurs de transcription dépendants de l'AMPc

1) Le cAMP-response element (CRE).

Montminy *et al.* (1986) ont identifié, dans le promoteur du gène de la somatostatine, une séquence requise pour la transcription AMPc-dépendante de ce gène. Ils l'ont baptisé CRE pour cAMP-response element. Cet élément de 30 paires de bases placé en amont du promoteur SV40 le rend inducible par l'AMPc, alors qu'il ne l'est normalement pas. A l'intérieur du CRE, ils ont observé une séquence palindromique, 5'-TGACGTCA-3', répétée ou non et hautement conservée au niveau des promoteurs de nombreux gènes dont on sait que leur transcription est dépendante de l'AMPc (PEPCK, VIP, Proenkephalin, c-*fos*). Etant donné l'absence d'homologie entre les séquences bordantes, il est possible que ce palindrome à lui seul contienne toute l'information nécessaire pour permettre la transcription (Roesler *et al.*, 1988). Le CRE fonctionne comme un "enhancer" classique, en ce sens qu'il fonctionne indépendamment de son orientation et de sa position par rapport au promoteur qu'il module.

2) Les protéines qui lient le CRE (CRE-binding proteins).

i) Introduction.

Historiquement, la première CRE-binding protéine à avoir été découverte était transactrivatrice. Il s'agissait d'une protéine de 43 kD purifiée à partir de cellules hypothalamiques de rat et baptisée CREB (Montminy & Bilezikjian, 1987). L'ADNc de cette protéine a été cloné par cette même équipe: il possède une ORF de 1023 paires de bases et code pour une protéine de 341 acides aminés (Gonzalez *et al.*, 1989).

A la même époque, une autre équipe clonait et séquençait un ADNc codant pour une CREB placentaire humaine de 326 acides aminés, d'une taille de 38 kD, homologue à la CREB de rat. Selon eux, cet écart de taille serait dû à des différences tissu- ou espèce-spécifiques ou encore à des modifications posttraductionnelles (Hoeffler *et al.*, 1988). Dans la suite nous verrons qu'il s'agissait en fait des deux produits de l'épissage alternatif d'un même transcrit primaire présent dans les deux types cellulaires (Berkowitz & Gilman, 1990).

Depuis lors, on a répertorié une pléthore de protéines homologues à la CREB de Montminy, qui peuvent, en réponse à l'AMPc, moduler la transcription des gènes soit positivement soit négativement.

Une autre appellation de ces protéines (ATF, Activating Transcription Factor) est née avec la découverte que CREB interagissait directement avec le facteur TFIID (TATA-binding factor) (Montminy *et al.*, 1990; Ferreri *et al.*,1994).

Toutes ces protéines appartiennent à la super-famille des b-Zip protéines. Cette super-famille contient bien d'autres protéines liant l'ADN, comme C/EBP, Jun, Fos, Myc et GCN4.

Dans la suite de ce chapitre, nous commencerons par décrire la structure-type des CRE-binding protéines à travers la structure de CREB. Ensuite nous décrirons l'activation de la transcription par CREB. Enfin, nous présenterons deux propriétés fondamentales des CRE-binding protéines qui illustrent la complexité de la régulation de la transcription par ces protéines.

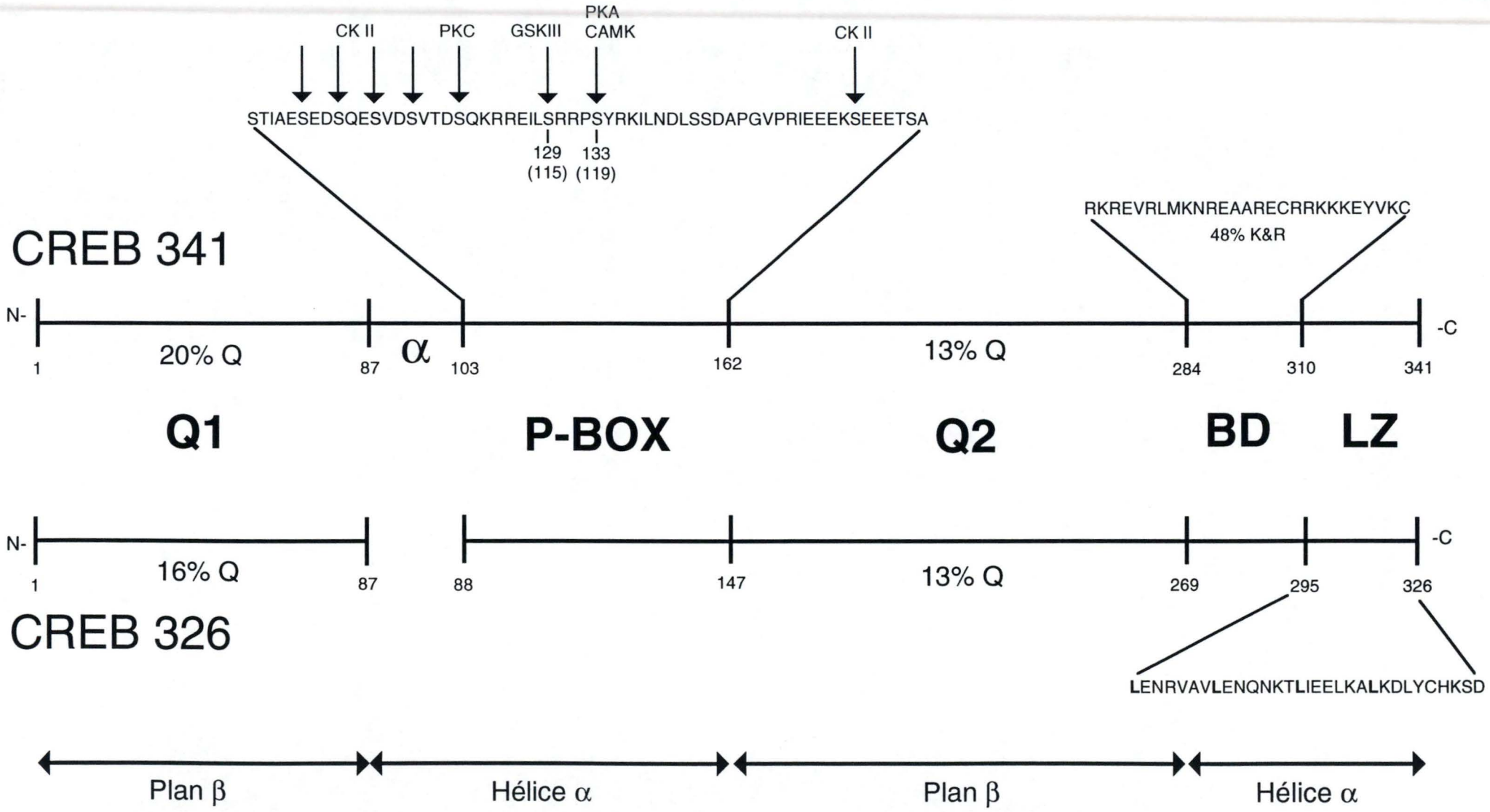


Figure 7: Structure des deux isoformes de CREB comportant 341 et 326 acides aminés.

Les domaines P-box, BD (basic domain) et LZ (leucine-zipper) sont identiques chez les deux isoformes.

ii) CREB, activateur transcriptionnel dépendant de l'AMPc.

Structure de CREB.

CREB est constituée de deux grands domaines: un domaine amino-terminal responsable de l'activation transcriptionnelle et un domaine carboxy-terminal responsable de la liaison à l'ADN et du contact protéine-protéine.

Le domaine amino-terminal, responsable de l'activation transcriptionnelle, se compose de deux régions (figure 7):

-une région centrale, appellée "P-box" ou "kinase-inducible domain", qui contient plusieurs sites de phosphorylation pour différentes kinases.

-une région riche en résidus glutamine séparée en deux parties, Q1 et Q2, entourant la "P-box". Actuellement on pense que la phosphorylation de la protéine induirait chez elle un changement de conformation qui exposerait les domaines Q1 et Q2 et leur permettrait ainsi d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle (Lalli & Sassone-Corsi, 1994).

Deux algorithmes de prédiction de structures secondaires ont permis de proposer une structure riche en hélices α pour la P-box et une structure riche en plans β pour les domaines Q1 et Q2 (Quinn, 1993).

Le domaine carboxy-terminal (domaine b-Zip) se compose de deux régions juxtaposées (figure 7):

-une région basique composée d'une trentaine d'acides-aminés (jusqu'à 50 % de lysine et arginine) formant une hélice α et qui permet la liaison à l'ADN.

-une région contenant une répétition de 4 leucines tous les sept résidus qui permet la dimérisation (Hoeffler *et al.*, 1988; Lalli & Sassone-Corsi, 1994).

Remarquons ici que beaucoup de facteurs de transcription eucaryotiques lient l'ADN au niveau de séquences palindromiques. L'utilité de ces séquences présentant une symétrie est apparue avec la découverte que certains facteurs liant ces séquences étaient capables de former des dimères, chaque monomère contactant une moitié du palindrome (Lamb & McKnight, 1991).

On a montré que les leucines des motifs b-zip s'alignaient le long du côté hydrophobe d'une hélice α amphipathique (figure 8). La dimérisation résulte de l'association, en parallèlle, de ces deux hélices en une super-hélice, appelée "**coiled-coil**" (figure 9). Le premier modèle proposé postulait que la dimérisation s'effectuait par l'interdigitation des chaînes latérales des résidus leucine comme les dents d'une tirette-éclair (**leucine-zipper**) (Landschulz *et al.*, 1988). La détermination de la stucture cristallographique du "coiled-coil" montre que les chaînes latérales des leucines ne s'interdigitent pas. C'est le caractère hydrophobe des chaînes latérales des leucines qui rapproche les deux hélices et permet leur

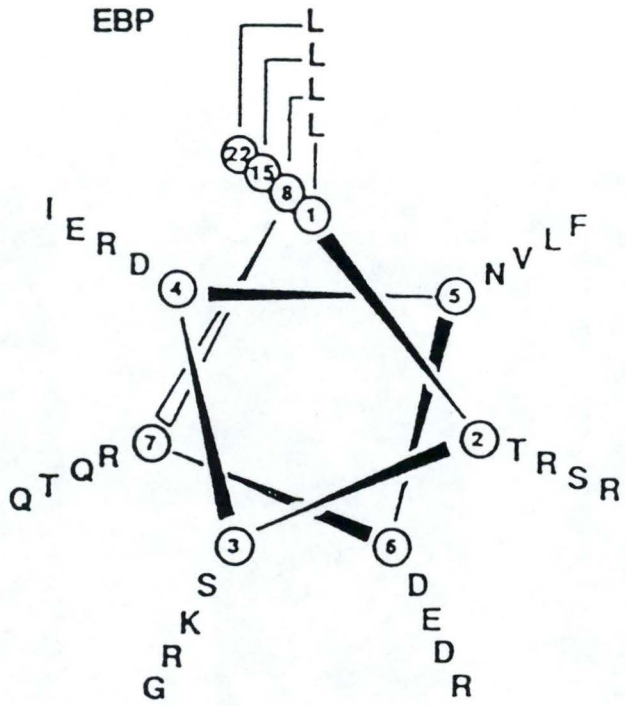


Figure 8: Analyse de la portion carboxy-terminale de la protéine b-Zip C/EBP. Les 4 leucines du motif b-Zip s'alignent le long du côté hydrophobe d'une hélice α amphiphatique. Le côté hydrophile opposé se compose de 4 acides aminés chargés (2 aspartates D, un glutamate E et une arginine R) (Landschulz *et al.*, 1988).

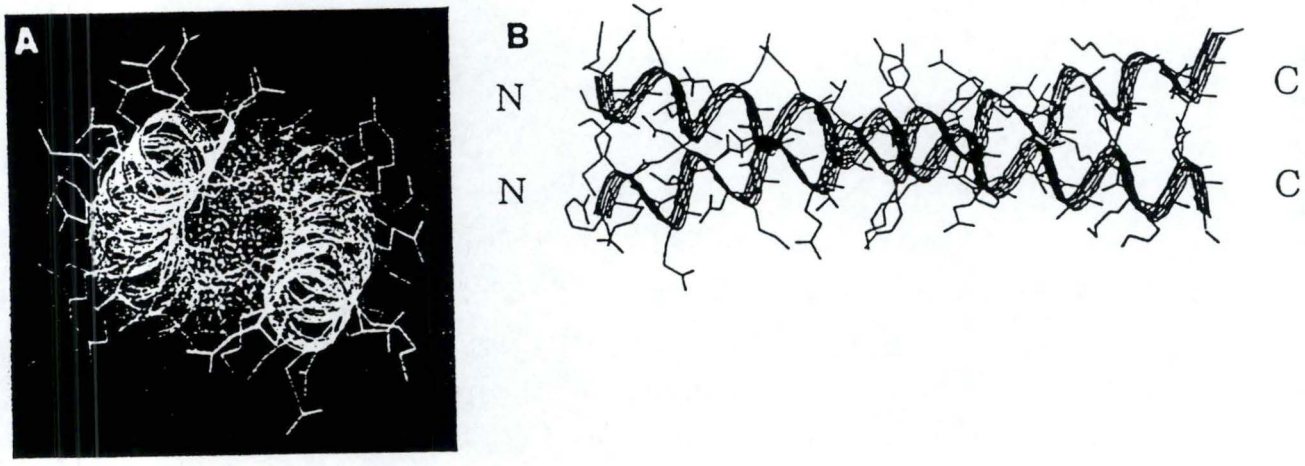


Figure 9: Illustrations du "coiled-coil" chez GCN4, un activateur transcriptionnel chez la levure.
A. Vue le long de l'axe central de la super-hélice depuis l'extrémité NH_2-terminale.
B. Vue latérale de l'association en parallèle des 2 hélices α formant le "coiled-coil" (O'Shea *et al.*, 1991).

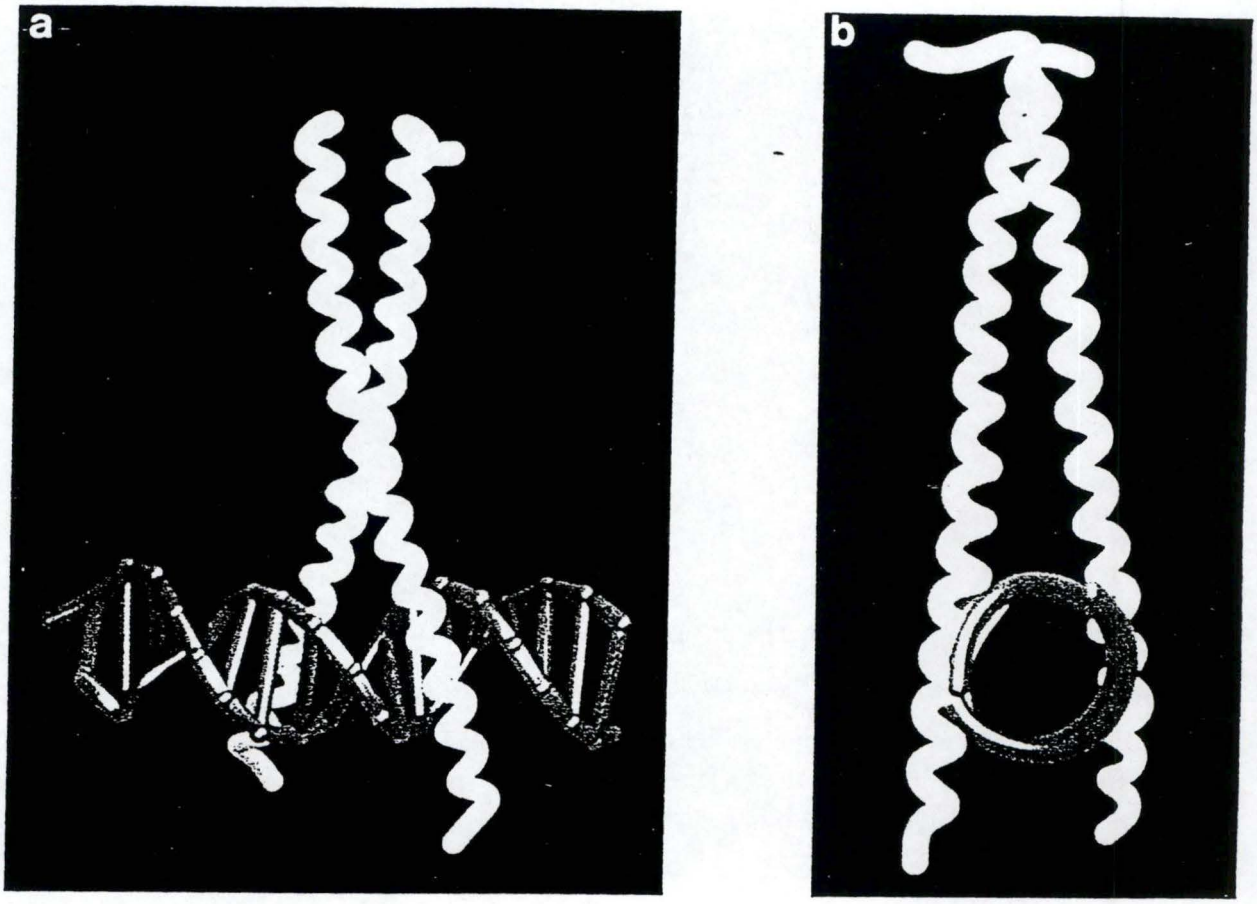


Figure 10: Structure du complexe ADN/b-Zip protéine, illustré par l'activateur GCN4.

A. Le dimère en b-Zip lie l'ADN au niveau du sillon majeur.

B. Vue le long du grand axe de l'ADN. Les acides aminés du domaine basique, chargés positivement, interagissent avec les phosphates de l'ADN, chargés, eux, négativement. Cette attraction de charges permet la stabilisation du complexe ADN-protéine.

enroulement. De plus, le dimère est stabilisé par des interactions polaires (ponts hydrogène) entre des résidus adjacents aux leucines (O'Shea *et al.*, 1989; O'Shea *et al.*, 1991). Le "coiled-coil" est orienté perpendiculairement à l'axe de la double-hélice d'ADN ce qui donne au complexe protéine-ADN une apparence de T majuscule (figure 10). La dimérisation permet de rapprocher les régions basiques de leur ADN-cible où elles pourront entrer en contact avec certaines bases spécifiques dans le sillon majeur. L'espace existant entre la région basique et la leucine-zipper conditionne leur orientation l'une par rapport à l'autre, et semble critique dans le processus de liaison à l'ADN (Lalli & Sassone-Corsi, 1994). La stabilisation du complexe ADN-protéine s'effectuerait grâce à l'attraction de charge entre les résidus basiques positifs de la protéine et les phosphates négatifs de l'ADN (Hoeffler *et al.*, 1988).

Régulation de CREB par phosphorylation/déphosphorylation.

A l'état inactif, CREB est capable de se lier spécifiquement à l'ADN au niveau de sites CRE contenus dans les promoteurs de divers gènes régulés par l'AMPc. Gonzalez & Montminy (1989) ont montré que la phosphorylation de CREB par la PKA au niveau de la Ser133[3] était indispensable pour activer la transcription de ces gènes. L'apport d'une charge négative par le phosphate pourrait permettre à CREB d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle basique. Mais l'incapacité du mutant Ser133 → Asp à transactiver indique que la phosphorylation de CREB activerait la transcription par un autre mécanisme que l'attraction entre charges opposées: un changement conformationnel provoqué par la fixation du phosphate permettrait d'exposer à la machinerie transcriptionnelle des régions distales de la Ser133 (Gonzalez & Montminy, 1989).

Sheng *et al.* (1991) ont montré que la Ser133 est aussi phosphorylée par des kinases Ca^{2+}-calmoduline-dépendantes. CREB pourrait servir à coordonner les signaux provenant des voies de transduction dépendantes du Ca^{2+} et de l'AMPc.

A côté de la sérine 133, CREB possède d'autres sérines, cibles d'autres kinases (caséine kinase II et PKC (Gonzalez *et al.*, 1989) et glycogène synthase kinase III (Fiol *et al.*, 1994) (figure 7).

La phosphorylation des protéines est un moyen de régulation couramment utilisé dans les cellules. On a montré récemment que la phosphorylation multiple était plus souvent la norme que l'exception. Ces phosphorylations se produisent dans un ordre bien précis, hiérarchisé, faisant intervenir des kinases primaires et secondaires. En phosphorylant leur cible, les kinases primaires

---

[3]le site de phosphorylation par la PKA se trouve en position 119 pour l'isoforme CREB A et en position 133 pour l'isoforme CREB B.

génèrent des sites reconnus par les kinases secondaires. Fiol *et al.* (1994) ont mis ce phénomène en évidence avec CREB. La glycogène synthase kinase III (GSK III) phosphoryle la sérine 129[4] après que la PKA ait produit un site $S_{129}RRPS^{Pi}$ (figure 7). La mutation de la Ser129 en une alanine non-phosphorylable diminue de 70 % la réponse de CREB à l'AMPc.

L'activation de la transcription AMPc-dépendante est un phénomène transitoire: le taux maximal de transcription est atteint 30 à 60 minutes après stimulation et décline ensuite régulièrement jusqu'à atteindre son niveau le plus bas 8 à 10 heures plus tard (Hagiwara *et al.*, 1992). L'atténuation de l'activité de CREB pourrait être due à une série de mécanismes incluant l'induction de protéases dégradant CREB, l'induction d'un inhibiteur spécifique de CREB, la déphosphorylation de CREB.
L'intervention de phosphatases dans l'atténuation transcriptionnelle suivant la stimulation de CREB par l'AMPc a été mise en évidence grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de phosphatases. Des quatre phosphatases de type Ser/Thr connues à ce jour, il semble que seules la PP-1 et la PP-2A soient impliquées (Hagiwara *et al.*, 1992; Wadzinski *et al.*, 1993).

Signalons enfin que Quinn (1993) a montré que CREB est constituée de différents modules fonctionnant indépendamment les uns des autres. La construction de mutants de délétion lui a permis de mettre en évidence une activité basale de CREB, indépendante de la PKA. Cette activité basale est localisée au niveau de deux domaines (aa 41-86 et aa 165-252) situés de part et d'autres de la P-box. Ces deux domaines peuvent agir indépendamment ou en synergie.

Comment CREB active-t-elle la transcription?

A ce jour, deux manières par lesquelles CREB activerait la transcription ont été proposées:

1°) Chrivia *et al.* (1993) ont montré que lorsque CREB est phosphorylée sur la Ser133, elle est capable de se lier à une protéine nucléaire CBP (CREB-binding protein). La P-box est nécessaire et suffisante pour la liaison de CREB à CBP. L'activation de la transcription proviendrait de l'interaction de CBP avec le facteur général de transcription TFIIB (Nordheim, 1994). L'initiation de la transcription d'un gène réclame la mise en place séquentielle d'un appareil basal

---

[4]la position 129 pour l'isoforme CREB B correspond à la position 115 pour l'isoforme CREB A.

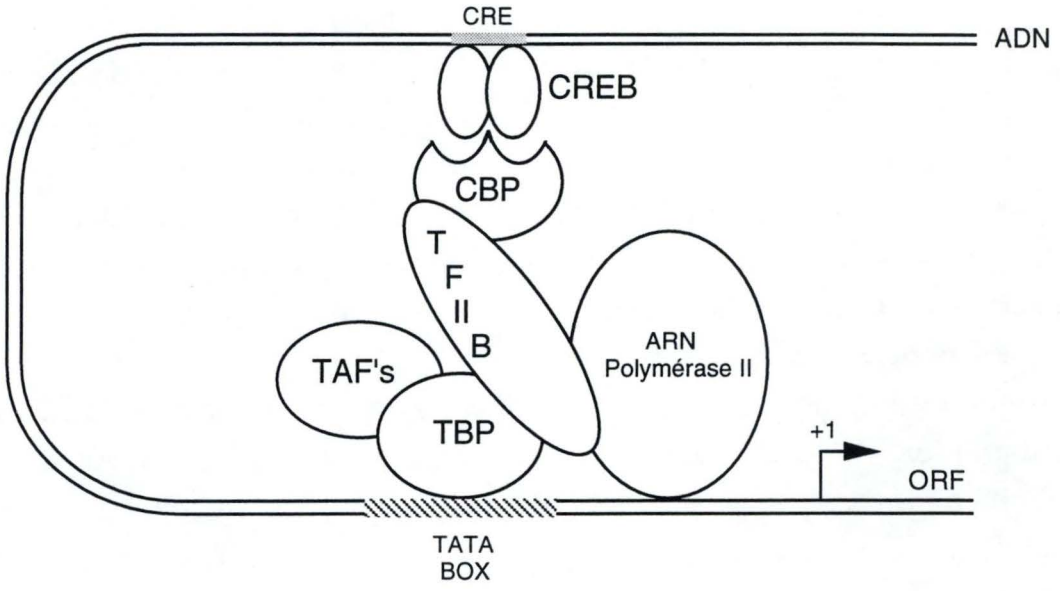


Figure 11: interaction de CREB avec la machinerie transcriptionnelle par l'intermédiaire de CBP.

de transcription constitué des facteurs généraux TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH et TFIIJ (Lewin, 1990; Sheldon & Reinberg, 1995). TFIID est un large complexe protéique constitué de TBP (TATA binding protein) associée à plusieurs autres facteurs (TAF's, TBP-associated factors). La fixation de TFIIB au niveau de TFIID est strictement nécessaire pour le recrutement de l'ARN polymérase II et son positionnement correct sur le promoteur.
CBP en interagissant avec TFIIB permettrait de réaliser une chaîne continue de contacts physiques reliant un facteur de transcription spécifique (CREB) à la machinerie transcriptionnelle (figure 11).

2°) On a découvert que CREB était capable d'interagir avec $dTAF_{II}110$, un facteur associé à TBP (Ferreri *et al.*, 1994). Il semble que le domaine Q2 soit directement impliqué dans l'interaction avec $dTAF_{II}110$, et plus particulièrement les acides aminés 204 à 213. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les répresseurs de type CREM qui ne possèdent pas le domaine Q2 sont transcriptionnellement inactifs.

iii) L'hétérodimérisation et l'épissage alternatif sont deux caractéristiques des CRE-Binding protéines.

L'hétérodimérisation

Les facteurs CREB/ATF sont fortement homologues au niveau de leur domaine b-Zip, alors qu'ils peuvent varier pour le reste de leur séquence. Cette conservation du domaine b-Zip permet la formation d'hétérodimères, selon un code de dimérisation qui n'autorise que certaines combinaisons particulières. L'hétérodimérisation au sein de la famille CREB/ATF permet d'introduire un niveau supplémentaire de régulation, en ce sens qu'un répresseur de la transcription (CREM, par exemple) peut s'associer à un facteur activateur et l'inhiber suite à la formation d'un hétérodimère non-fonctionnel (Lalli & Sassone-Corsi, 1994).
Le problème se corse encore depuis que l'on a découvert des hétérodimères entre les familles de facteurs de transcription Fos/Jun et CREB/ATF (Hai & Curran, 1991). Auparavant, on distinguait ces deux familles de b-Zip protéines suivant leur spécificité de liaison au niveau de l'ADN. Les facteurs du type Fos/Jun, activés par la voie de transduction du signal dépendante du diacylglycérol (DAG) et de la PKC, se lient préférentiellement au TRE (TPA-responsive element) de séquence 5'-TGACTCA-3' alors que les facteurs CREB/ATF préfèrent le motif CRE 5'-TGACGTCA-3'. La ressemblance entre le CRE et le TRE (une seule base de

différence entre les deux) ainsi que l'existence d'hétérodimères intra-familiaux a soulevé la question de savoir s'il ne pouvait pas exister des hétérodimères entre membres de ces deux familles. La confirmation de cette hypothèse a amené Hai & Curran (1991) à classer ces deux familles dans une super-famille de facteurs de transcription.

Une conséquence fondamentale de l'hétérodimérisation entre ces deux familles est d'offrir la possibilité d'une communication au niveau nucléaire entre deux voies majeures de la transduction du signal, à savoir la voie dépendante de l'AMPc et de la PKA et la voie dépendante du DAG et de la PKC (Lalli & Sassone-Corsi, 1994).

L'épissage alternatif.

La complexité de la famille CREB-ATF est encore renforcée par l'existence d'un épissage alternatif qui permet, à partir d'un même transcrit primaire, l'obtention de plusieurs produits révélant des propriétés différentes. Deux exemples seront employés pour éclairer ce point:

Exemple 1:

Berkowitz & Gilman (1990) ont montré que les cellules mammaliennes exprimaient deux formes distinctes de l'activateur transcriptionnel CREB, CREB-A et CREB-B, comportant respectivement 327 et 341 acides aminés. A part l'insertion d'un fragment de 14 acides aminés entre les positions 88 et 102 de CREB-B, CREB-A et CREB-B sont identiques en tous points.

Il est intéressant de remarquer que: 1°) CREB-A est pratiquement identique à la protéine de type CREB dont le gène a été cloné par Hoeffler *et al.* (1988) dans des cellules placentaires humaines; 2°) la protéine CREB clonée dans des cellules de cerveau de rat (Gonzalez *et al.*, 1989) est identique à CREB-B et contient une région α qui recouvre exactement la zone de l'insertion dans CREB-B.

Il apparaît dans cette étude que CREB-A et CREB-B seraient les produits de l'épissage alternatif d'un même transcrit primaire. La différence de taille observée entre les protéines CREB de cerveau de rat et de placenta humain n'est donc pas due à une différence inter-spécifique mais confirme que les deux isoformes de CREB sont présentes dans tous les types cellulaires.

La présence de trois résidus sérine et d'un résidu thréonine au sein de l'insertion entre CREB-A et CREB-B permettrait de fournir une cible supplémentaire à la phosphorylation par des kinases. Cette nouvelle alternative de phosphorylation à l'extérieur de la P-box pourrait activer CREB en synergie avec la phosphorylation PKA-dépendante ou au contraire constituer une phosphorylation antagoniste (Berkowitz & Gilman, 1990).

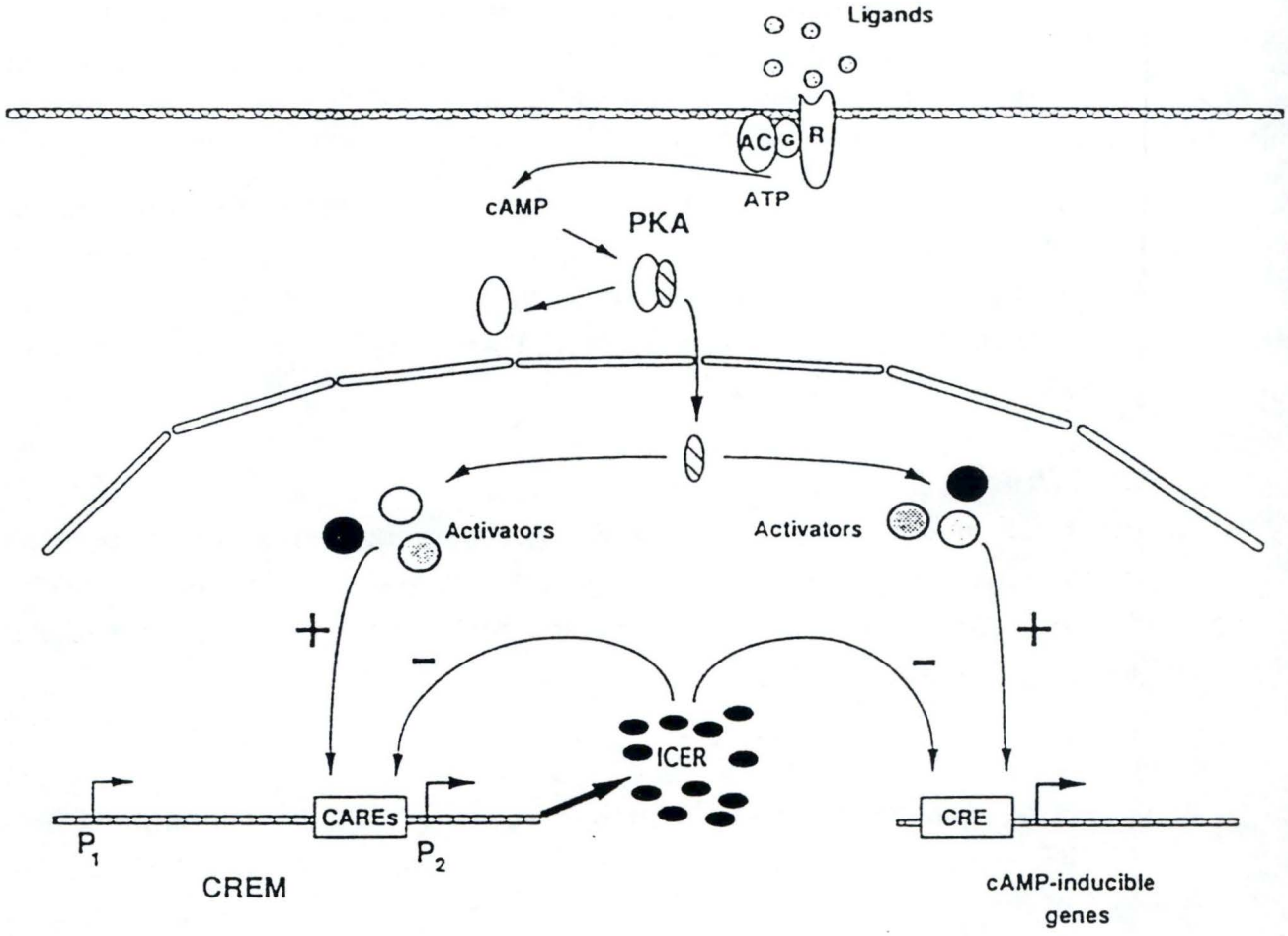


Figure 12: Schéma de l'induction des gènes ICER's par l'AMPc, ainsi que de leur autorégulation.
P_1: promoteur "normal" des gènes CREM, non-inductible par l'AMPc.
P_2: promoteur alternatif situé dans un intron et contenant des CAREs (cAMP autoregulatory elements) qui sont formés de la répétition de 4 CRE en tandem.

Un mode de régulation supplémentaire de l'activité dépendante de l'AMPc de ces deux activateurs transcriptionnels pourrait provenir de leur hétérodimérisation soupçonnée par Berkowitz & Gilman (1990).

Exemple 2:

Foulkes et al. (1991) ont isolé un gène CREM codant pour plusieurs isoformes d'une protéine homologue à CREB. Successivement, depuis l'extrémité 5' de ce gène, on trouve:

- une ORF de 687 pb qui code pour CREMα et qui contient une région P-box et un domaine b-Zip I homologues à leurs équivalents chez CREB.
- un stop suivi d'une région non-codante d'environ 200 pb.
- une seconde ORF, dans une phase de lecture différente, codant pour un domaine b-Zip II. Par un épissage alternatif, ce domaine peut remplacer le domaine b-Zip I de CREMα, ce qui génère l'isoforme CREMβ.

Il existe une troisième isoforme, CREMγ, qui possède aussi le domaine b-Zip II mais qui présente une délétion du côté 5', ce qui la rend plus courte que CREMβ.
Ces trois protéines CREM présentent la même spécificité de liaison que CREB pour le CRE, mais au contraire de CREB il s'agit d'effecteurs négatifs de la transcription par le fait qu'ils inhibent CREB.

iv) Les répresseurs de la transcription AMPc-dépendante

Il existe deux types de répresseurs de la transcription AMPc-dépendante: des répresseurs exprimés constitutivement et des répresseurs dont la synthèse est induite par l'AMPc.
CREMα, -β et -γ font partie des répresseurs exprimés constitutivement.
Au contraire de CREB qui est ubiquiste, l'expression de CREM est cellule-spécifique et génère au moins trois isoformes par épissage alternatif. Dans une cellule particulière, la présence ou l'absence de répresseurs CREM conditionnerait donc la réponse transcriptionnelle AMPc-dépendante (Foulkes et al., 1991).
Plus récemment, on a découvert de nouvelles isoformes de CREM (ICER's, inducible cAMP early repressor's) dont l'expression est fortement inductible par l'AMPc (Molina *et al.*, 1993; Lalli & Sassone-Corsi, 1994). Un promoteur P_2 situé dans un intron en amont du promoteur P_1 "normal" et contenant quatre CRE's en tandem dirige la transcription de petits ARN qui codent pour les plus petits facteurs nucléaires liant le CRE identifiés à ce jour. En effet ceux-ci ne contiennent que le domaine b-Zip de liaison à l'ADN et sont totalement dépourvus de P-box et de domaines riches en Q, ce qui fait d'eux de puissants

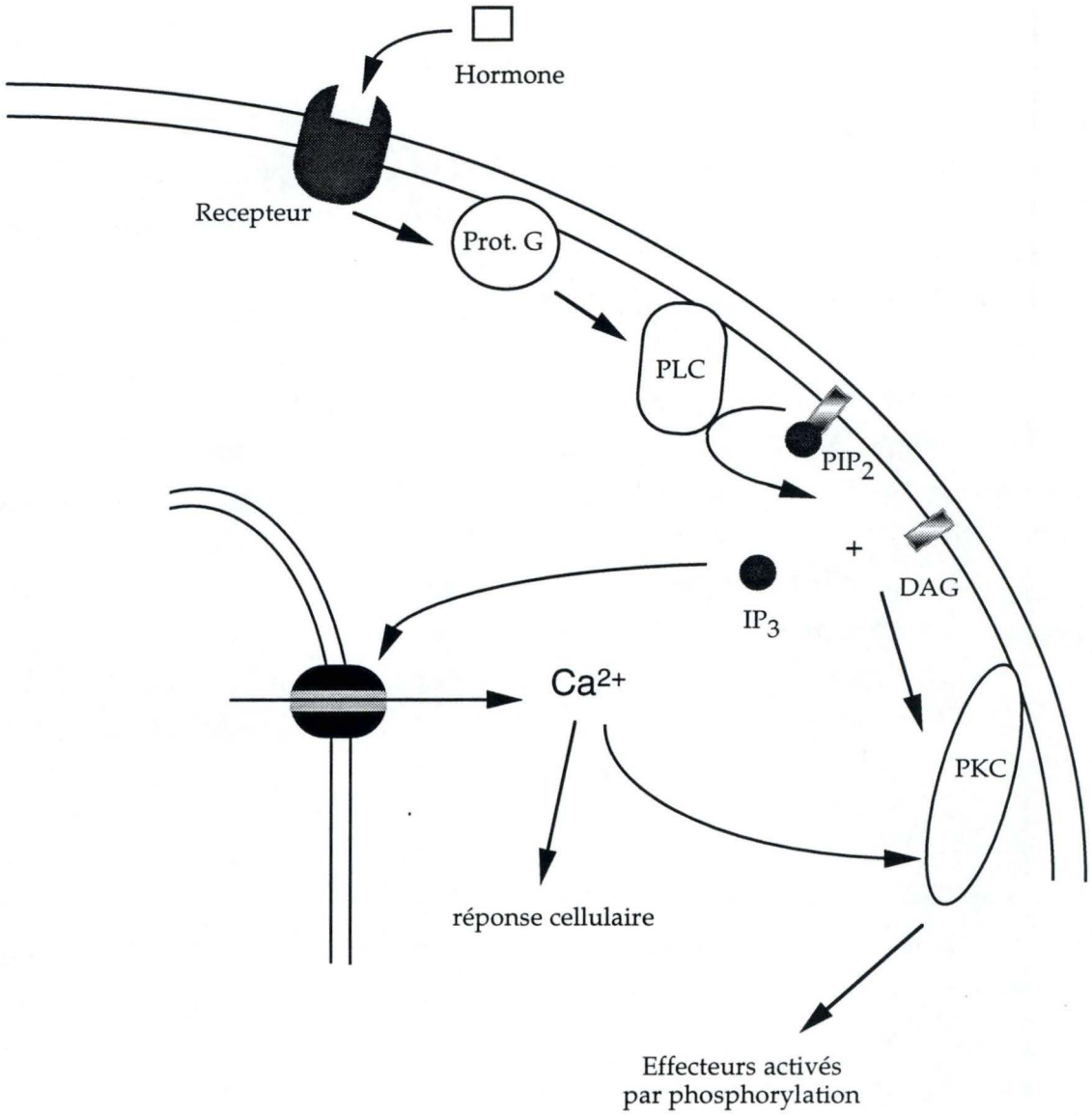


Figure 13: Voie de transduction du signal dépendante du DAG et de l'IP3 chez les cellules animales.

La liaison d'une hormone à son récepteur provoque l'activation de la protéine G. Celle-ci active une phospholipace (PLC) qui clive le PIP2 membranaire en DAG et en IP3. Le DAG reste membranaire et active la Protéine Kinase C (PKC). L'IP3 libéré dans le cytoplasme se fixe au niveau d'un canal à Ca2+ du réticulum endoplasmique, ce qui provoque une décharge d'ions Ca2+ vers le cytosol. Ces ions Ca2+ ont des effets multiples, parmi lesquels l'activation de la PKC.

La PKC activée va transmettre le signal de départ en phosphorylant des cibles cytoplasmiques et nucléaires.

répresseurs de la transcription AMPc-dépendante de par leur capacité à former avec CREB des hétérodimères inactifs.
L'activation de la PKA semble donc provoquer la cascade d'événements nucléaires suivants (figure 12):
1°) la sous-unité catalytique de la PKA phosphoryle et active des facteurs préexistants qui vont stimuler l'expression de gènes-cible, dont les ICER's.
2°) le taux accru d'ICER's dans la cellule est responsable du déclin de l'expression AMPc-dépendante.
3°) les ICER's répriment leur propre expression dans une boucle de rétroaction, ce qui ramène le système à un niveau basal avant une nouvelle stimulation.

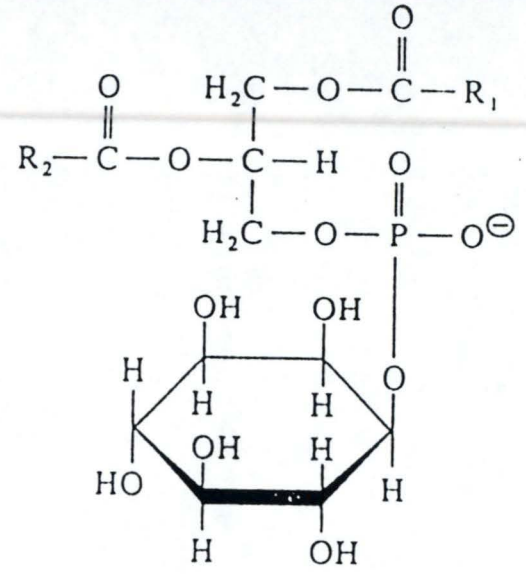
III) Indices de l'existence d'une voie de Transduction du Signal dépendante de l'AMPc chez les Plantes.

A) Aperçu général de la transduction du signal chez les plantes.

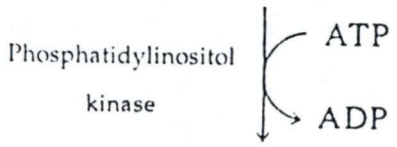
Les systèmes de transduction du signal chez les végétaux ont jusqu'à présent été moins étudiés que leurs équivalents animaux. Dans les années 80, les recherches portant sur l'amélioration des espèces cultivées se sont étendues à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans toute une série de phénomènes tels que la régulation de la croissance, la relation hôte-pathogène, la résistance au stress hydrique, les réactions de mûrissement, ... Mais malgré l'identification de nombreux intermédiaires de la transduction du signal chez les végétaux, aucune voie n'a pu encore être décrite dans son intégralité, depuis la perception d'un signal extracellulaire jusqu'à la modification de l'expression génétique en passant par l'activation enzymatique. Actuellement de nombreuses recherches sont consacrées à la mise en évidence de récepteurs transmembranaires qui seraient activés par l'auxine, l'acide abscissique et l'acide gibbérellique, trois hormones végétales qui interviennent dans le développement.
Un des défis majeurs de ces prochaines années sera de rassembler toutes ces informations en un schéma cohérent de transduction du signal. Ci-dessous sont présentés les éléments participant à la transduction du signal déjà élucidés chez les végétaux.

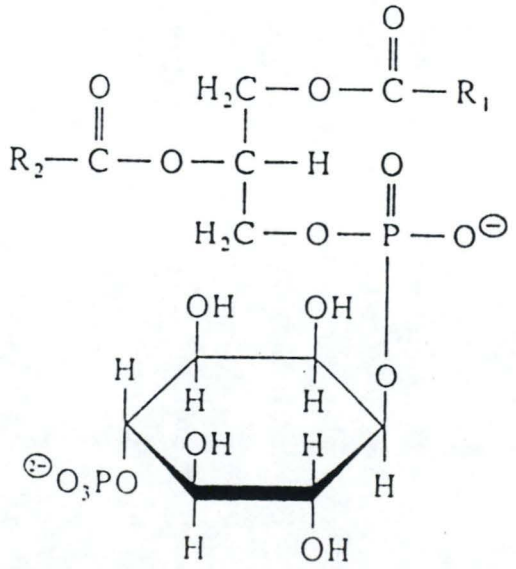
1.- Voie des phosphoinositides et du calcium.

La figure 13 résume la voie des phosphoinositides chez les cellules animales.
On a trouvé des équivalents fonctionnels et/ou structurels à la plupart des composants cette voie chez les plantes (Drøbak, 1993).

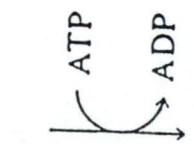


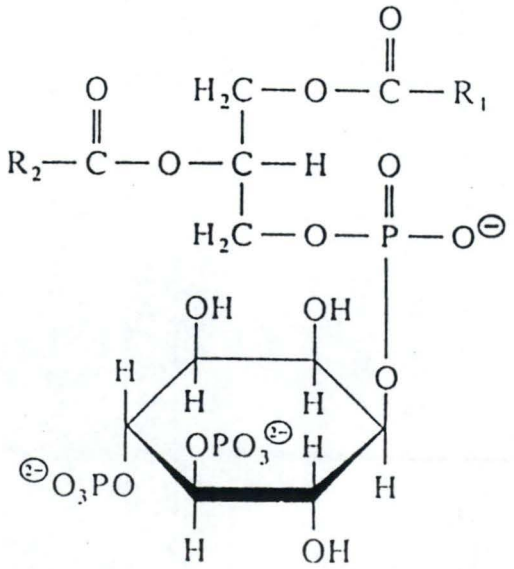
Phosphatidylinositol





Phosphatidylinositol 4-phosphate





Phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate

Figure 14: Biosynthèse du phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP_2) à partir du phosphatidylinositol (PI) (Rawn, 1990).

Nous discuterons plus loin de la présence des **protéines G** chez les plantes.

Deux types de **phospholipases C (PLC)** végétales ont été identifiées à ce jour: les PLC de type I sont des enzymes solubles et clivent préférentiellement le phosphatidylinositol (PI) aux polyphosphoinositides (PPI). Leur rôle cellulaire n'a pas encore été identifié. Les PLC de type II sont mieux connues: il s'agit d'enzymes principalement associées à la membrane et qui nécessitent le Ca^{2+} pour être actives (Pical *et al.*, 1992). Elles présentent une forte affinité pour les polyphosphoinositides, ce qui les rapproche des PLC mammaliennes. La confirmation de cette parenté est venue de l'identification chez les plantes de protéines homologues à la profiline mammalienne, un protéine qui inhibe l'activité de la PLC en formant des complexes avec le PIP_2. Drøbak et al. (1994) ont montré *in vitro* que la profiline de bouleau liait au moins dix molécules de PIP_2 et diminuait drastiquement l'activité de la PLC végétale.

Le **PI** (figure 14) est un des phospholipides majeurs des cellules végétales: il peut constituer jusqu'à 20 % de la quantité totale des phospholipides membranaires. Le phosphatidylinositol 4-phosphate (**PIP**) et le **PIP_2** (figure 13) constituent respectivement 1 à 2 % et moins de 0.05 % de la totalité des phospholipides cellulaires (contre 2 à 8 % pour le PIP_2 dans les cellules animales; Rawn, 1990). Des kinases et des phosphatases spécifiques des phosphoinositides ont été caractérisées chez de nombreux végétaux: elles favoriseraient un turn-over rapide du PIP et du PIP_2, ce qui expliquerait leurs concentrations assez faibles à un instant donné.

De nombreuses études ont porté sur l'identification de kinases végétales membranaires qui auraient un rôle équivalent à la **PKC** mammalienne. Bien qu'il y ait des homologies de séquences entre des protéines végétales et des protéines kinases animales de type sérine/thréonine (famille à laquelle appartient la PKC) (Lawton *et al.*, 1989; Biermann *et al.*, 1990) et bien qu'il y ait des PK végétales Ca^{2+}-dépendantes, on n'a pas encore pu montrer qu'elles intervenaient dans la voie des phosphoinositides. En effet on n'a pas pu mettre en évidence une activation de ces protéines par le **DAG**, contrairement à ce qui se passe dans les cellules animales. Le DAG possède cependant une activité fondamentale pour les végétaux: il médie l'ouverture des stomates des feuilles en reproduisant l'effet hyperpolarisant de la lumière bleue.

Par contre l'**IP_3**, dans les cellules végétales, pourrait être impliqué dans un processus assez semblable à ce qui a lieu chez les cellules animales. Kurosaki *et al.* (1987) ont montré une augmentation de l'activité de la PLC et de la concentration en IP_3 en réponse à l'élicitation de cellules de carotte par des fragments pectiques. Il s'ensuivait une synthèse rapide de 6-méthoxymelléine, une phytoalexine répandue. L'utilisation d'inhibiteurs de la calmoduline

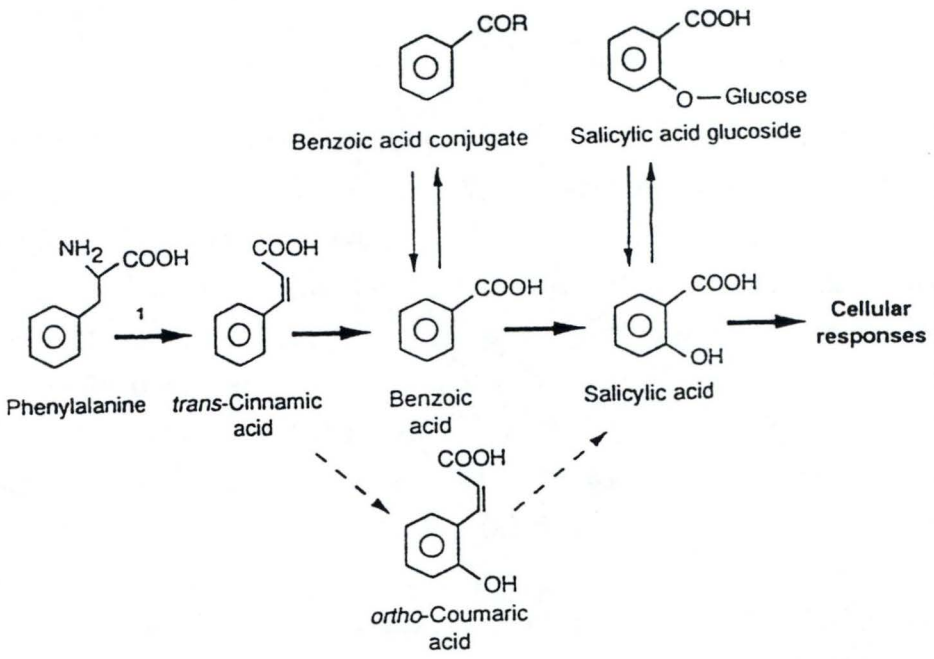


Figure 15: Synthèse de l'acide salicylique à partir de la phénylalanine. La PAL catalyse la déamination de la phénylalanine, première étape de la synthèse (Dempsey & Klessig, 1994).

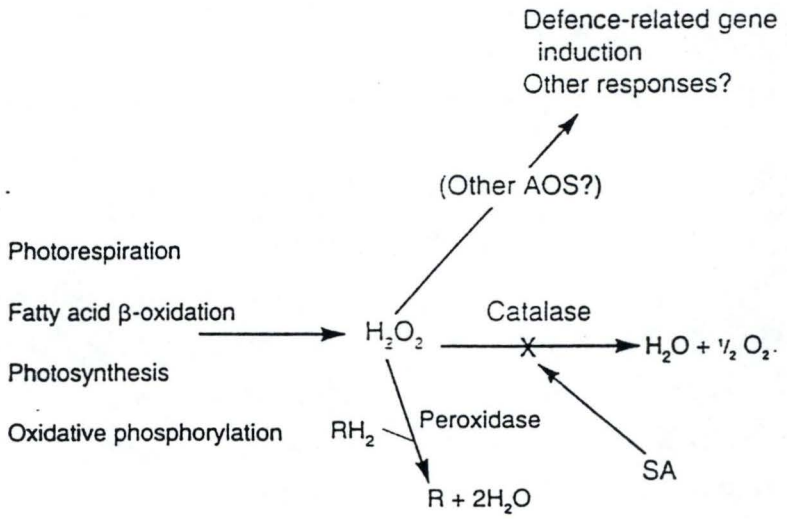


Figure 16: Transduction du signal dépendante de l'acide salicylique chez les plantes. L'acide salicylique, synthétisé en réponse à une attaque pathogène inhiberait une catalase. Ceci induirait une augmenattion de la concentration en H_2O_2 intracellulaire, qui provoquerait elle-même l'induction de gènes de défense (Dempsey & Klessig, 1994).

empêchait la synthèse de 6-méthoxymelléine. Suite à ces expériences, ils ont émis l'hypothèse que, chez les végétaux, l'IP_3 libéré de la membrane par une PLC pouvait, comme chez les cellules animales, être impliqué directement dans la mobilisation du Ca^{2+} cytosolique. L'IP_3 agirait sur des canaux calciques situés au niveau du tonoplasme, membrane qui délimite la vacuole, principale réserve de Ca^{++} dans la cellule végétale. La récente découverte d'un récepteur à l'IP_3 de haute affinité logé dans le tonoplasme est venue confirmer cette hypothèse (Brosnan & Sanders, 1993).

2.- Acide salicylique , catalase, H_2O_2 et dérivés actifs de l'oxygène.

On a observé que de nombreux végétaux, ayant subi une attaque pathogène localisée, développaient au niveau des zones non-atteintes par le pathogène une résistance de longue durée à des infections secondaires, qu'elles soient le fait du même pathogène ou d'un pathogène différent. Ce phénomène de résistance non-spécifique a été appellé "systemic acquired resistance" (SAR) et s'accompagne de l'expression coordonnée d'un ensemble de gènes codant pour des protéines "pathogenesis-related" (PR) (Vernooij *et al.*, 1994). On a montré *in vitro* que les protéines PR avaient des activités antimicrobiennes: parmi elles on a mis en évidence des glucanases, des chitinases et des osmotines qui sont capables de dégrader et de perméabiliser les parois fongiques (Dempsey & Klessig, 1994).
En traitant des feuilles de tabac avec de l'acide salicylique ou avec de l'aspirine (acide acétylsalicylique), on a provoqué chez elles une résistance au virus de la mosaïque du tabac (TMV) ainsi que l'accumulation de protéines PR. L'hypothèse de l'acide salicylique comme molécule-signal était née! Les taux élevés d'acide salicylique dosés chez des plants de tabac résistants au TMV sont venus soutenir cette hypothèse. Il est intéressant de remarquer ici que la PAL, qui est activée en réponse à une attaque pathogène et dont on sait qu'elle participe à la voie de synthèse des phytoalexines et de la lignine, interviendrait dans la synthèse de l'acide salicylique (figure 15) (Dempsey & Klessig, 1994).
La découverte récente d'une protéine du tabac fixant l'acide salicylique (SA-binding protein, SABP) a permis de proposer un mode d'action de ce composé phénolique. On a montré que la SABP était une catalase et que après avoir lié l'acide salicylique elle devenait incapable de catalyser la réaction de réduction de l'H_2O_2 en H_2O+ O_2. En inhibant la catalase, l'acide salicylique fait augmenter la concentration intracellulaire d' H_2O_2 et d'autres dérivés actifs de l'oxygène produits constitutivement par le métabolisme cellulaire (figure 16). Ceux-ci pourraient alors servir de messagers secondaires induisant l'expression des gènes PR ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des phytoalexines.

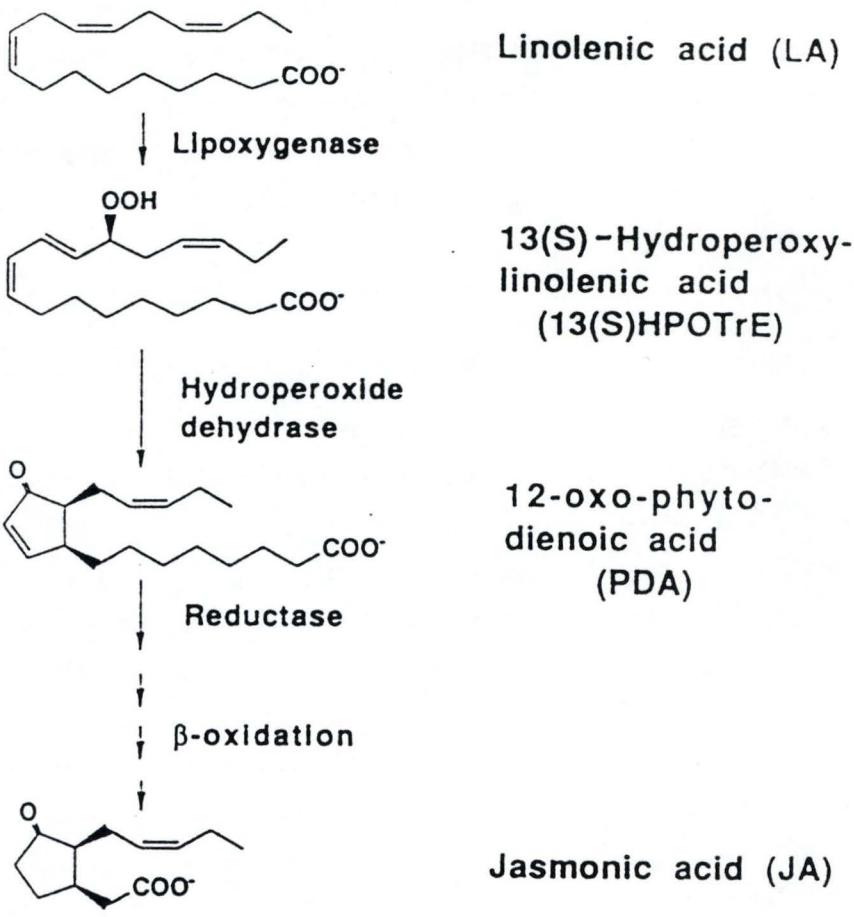


Figure 17: Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique à partir de l'acide α-linolénique (18:3) (Farmer and Ryan, 1992).

Cette hypothèse s'est vue confirmée par l'injection d'H_2O_2 dans des feuilles de tabac provoquant chez ces dernières une résistance au TMV ainsi que l'induction de l'expression de gènes PR (Dempsey & Klessig, 1994). Cette induction pourrait être sous l'influence du calcium dont on a montré qu'il augmentait transitoirement suite à l'application d'H_2O_2 sur des plantules de tabac (Price *et al.*, 1994).

De plus, le fait que les cellules mammaliennes utilisent les dérivés actifs de l'oxygène comme messagers secondaires de l'induction génétique par le biais de l'activation du facteur de transcription NF-KB indiquerait la conservation d'un mode de transduction du signal entre les animaux et les végétaux (Dempsey & Klessig, 1994).

Notons encore que chez les plantes, les dérivés actifs de l'oxygène (H_2O_2, $O_2^{\cdot -}$ et $OH^{\cdot}$) participent aussi à une explosion "respiratoire" au niveau de la paroi cellulaire permettant la destruction directe du pathogène les ayant attaquées, d'une façon tout-à-fait similaire à ce que l'on observe dans les phagolysosomes des macrophages et des neutrophiles (Mehdy, 1994).

3.- *La voie de l'acide jasmonique et de ses analogues.*

L'acide jasmonique, le méthyljasmonate et leurs précurseurs lipidiques à 18 carbones sont synthétisés à partir de l'acide α-linolénique (18:3) dans une cascade de réactions enzymatiques (figure 17). On a montré qu'ils induisaient, localement ou à distance, la synthèse d'inhibiteurs de protéinases en réponse à des dommages mécaniques ou à une attaque pathogène. Farmer & Ryan (1992) ont proposé un système de transduction du signal lipidique faisant intervenir une phospholipase qui libérerait l'acide linolénique de la membrane et rendrait ainsi possible la synthèse du méthyljasmonate et de ses précurseurs (figure 18). Ils ont en outre postulé que l'activation de l'expression de gènes spécifiques par le méthyljasmonate serait médiée par un récepteur cytoplasmique, ce qui est confirmé par la saturabilité du phénomène.

On peut établir un parallèle intéressant entre la voie de l'acide jasmonique et la voie des leucotriènes et des prostaglandines chez les animaux (Farmer & Ryan, 1992). Les leucotriènes et les prostaglandines, qui sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique (20:4), dérivé de l'acide linoléique (18:2) sont en effet impliqués dans les réponses inflammatoires dans les cellules animales.

Plus récemment des expériences ont montré que, en plus d'induire la synthèse d'inhibiteurs de protéinases et d'autres gènes de défense (JIPs, jasmonate-induced proteins), l'acide jasmonique réprimerait la synthèse de protéines préexistantes aux JIPs et impliquées dans l'assimilation photosynthétique du carbone. La

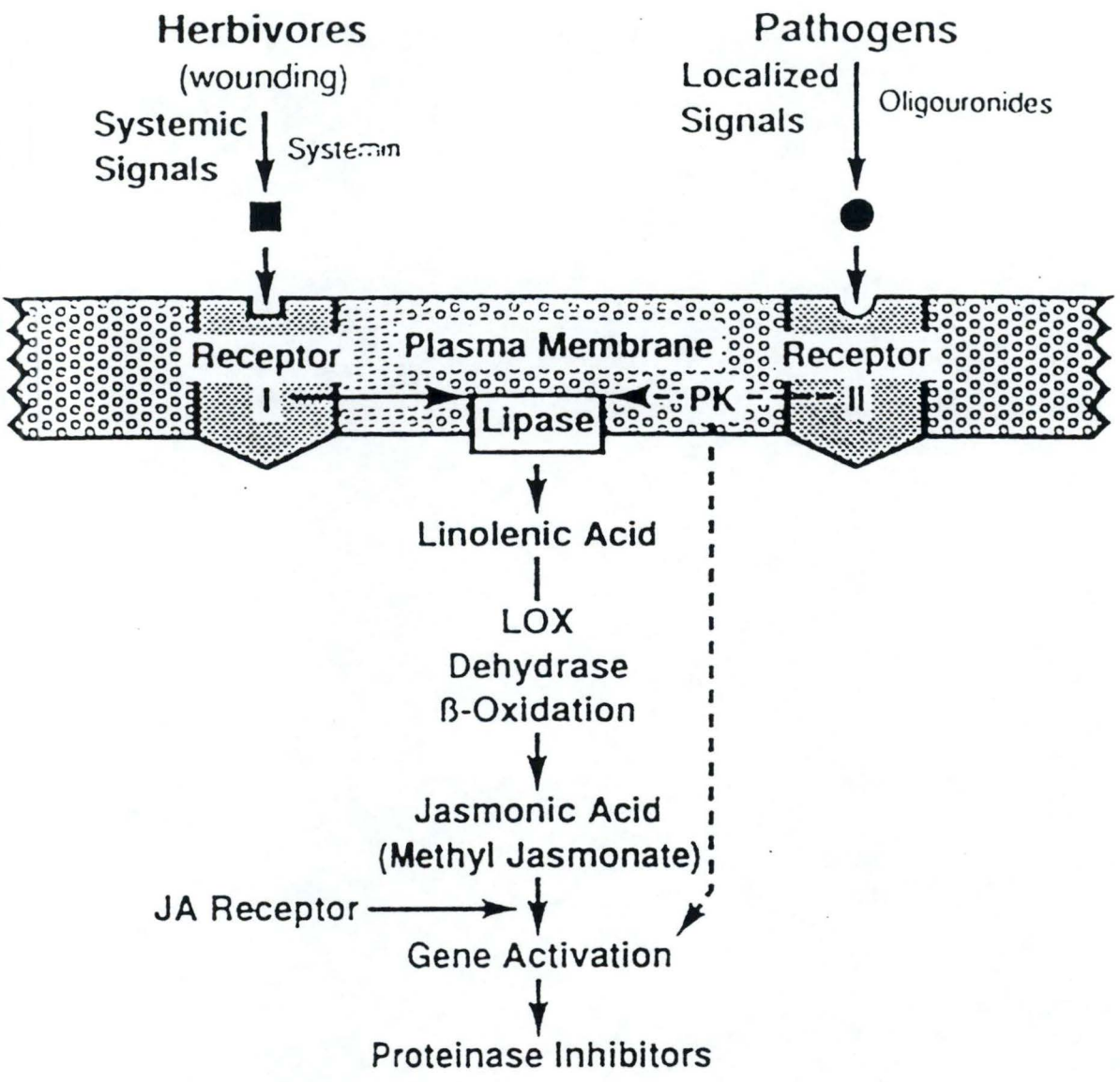


Figure 18: Modèle proposé par Farmer et Ryan (1992) pour expliquer la synthèse d'inhibiteurs de protéinases en réponse à une attaque pathogène ou à des dégâts mécaniques. La systémine (un peptide relargué en cas de blessure mécanique) et les oligouronides (produits lors de la dégradation de la paroi végétale par un pathogène) vont servir de signaux extracellulaires et provoquer l'activation d'une lipase membranaire. L'acide linolénique libéré de la membrane par la lipase est le précurseur de l'acide jasmonique, qui induirait l'activation de gènes d'inhibiteurs de protéinases.

dégradation de ces protéines assurerait une réserve d'acides aminés nécessaires à la synthèse *de novo* des JIPs (Reinbothe *et al.*, 1994).

4.- L'éthylène active des facteurs de transcription qui interagissent avec un "Ethylene -Responsive Element".

L'éthylène est une hormone végétale gazeuse dont on étudie les effets depuis longtemps: elle est impliquée dans une série de phénomènes liés à la croissance et au développement comme la germination, la sénescence, l'abscission des feuilles, le mûrissement des fruits, ... La voie de synthèse de l'éthylène a été établie et plusieurs gènes codant pour des enzymes participant à cette voie ont été clonés. Très souvent l'éthylène est produit chez une plante en réponse à un stress, quel que soit son type. On parle d'ailleurs de l'éthylène du stress.
Chappell *et al.* (1984) ont montré que l'activité de l'ACC synthase, l'enzyme-clé de la voie de synthèse de l'éthylène, augmentait fortement suite à une infection par un pathogène. L'élévation du taux d'éthylène ainsi provoquée dans les cellules est rapidement suivie par l'expression de gènes de résistance aux pathogènes.
L'étude des régions promotrices des gènes PR inductibles par l'éthylène a permis d'identifier une séquence de 11 pb (5'-TAAGAGCCGCC-3'), appelée GCC box ou encore ERE (ethylene-response element) indispensable pour l'expression éthylène-dépendante des gènes PR. Il doit donc y avoir une voie de transduction du signal dépendante de l'éthylène qui aboutirait à l'activation de facteurs de transcription induisant l'expression des gènes PR (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Ohme-Takagi & Shinshi ont cloné et séquencé quatre ADNc de tabac codant pour des protéines liant une sonde ERE. Ces ERE-binding protéines (EREBP's) ne présentent aucune homologie de séquence avec des facteurs de transcription connus et ne possèdent aucun motif connu de liaison à l'ADN (b-Zip ou doigt-de Zinc, par exemple). L'analyse par ordinateur de la structure secondaire du domaine de liaison à l'ADN des EREBP's suggère la formation de deux structures α-hélicales séparées par des régions s'assemblant en un brin β. Il est fort probable que ce motif de liaison à l'ADN soit répandu chez les plantes car des comparaisons de séquences ont montré une forte homologie entre le domaine de liaison à l'ADN des EREBP's et des protéines végétales de fonction inconnue.

B) L'AMPc comme messager secondaire chez les Plantes.

La question de savoir si l'AMPc est un signal intracellulaire chez les plantes est encore aujourd'hui très controversée. Début des années 80, plusieurs groupes ont essayé de mesurer les taux d'AMPc dans différents tissus végétaux: ils

atteignaient des valeurs comprises entre 1 et 1500 pmoles/g de poids frais. Ces valeurs étaient en concordance avec les taux d'AMPc mesurés dans les cellules animales qui oscillent entre 100 et 500 pmoles/g de poids frais. Des recherches plus récentes ont montré qu'il y avait eu une grave erreur lors des premiers dosages de l'AMPc chez les cellules végétales: les techniques de l'époque ne permettaient pas de distinguer le 2',5'-AMPc du 3',5'-AMPc et avaient donc surestimé le taux de ce dernier (Assmann, 1995). En 1989, Spiteri *et al.*, en utilisant des techniques de radioimmunologie, ont établi que, dans tous les tissus végétaux qu'ils avaient testés, le taux d'AMPc était inférieur à la limite de détection de 0.5 pmoles/g de poids frais (environ 0.5 nM).

Plus récemment, des équipes travaillant sur des cellules particulières ont mesuré, au moyen des mêmes techniques que Spiteri, des taux d'AMPc plus élevés qui paraissent justifier les recherches faites dans la direction d'une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les plantes. Il s'agit des travaux de Ishioka & Tanimoto (1990) (36 pmoles AMPc/g de poids frais, environ 36 nM) et de Gangwani *et al.* (1991) (entre 70 et 80 pmoles AMPc/g de poids frais, environ 70 nM).

Ces résultats suggèrent que les taux d'AMPc pourraient fortement varier d'une espèce végétale à l'autre, d'un organe à l'autre, voire d'un type cellulaire à l'autre, ce qui explique que le taux moyen d'AMPc dans un tissu paraisse si bas. D'autres expériences ont aussi mis en évidence que la concentration de l'AMPc pouvait être modifiée en fonction des conditions de culture du végétal (la lumière, par exemple) et qu'elle présentait des variations spatiales et temporelles (Assmann, 1995).

De ce qui précède, on peut conclure que de manière générale les taux d'AMPc mesurés chez les plantes sont nettement inférieurs à ceux mesurés chez les animaux. Cependant cette conclusion ne s'oppose pas à l'hypothèse selon laquelle l'AMPc serait une molécule-signal chez les cellules végétales. En effet, plutôt que sa concentration moyenne, c'est l'augmentation transitoire en AMPc dans la cellule qui serait effectrice.

Plusieurs équipes ont étudié les réponses biologiques engendrées par l'application exogène d'AMPc. La plupart des expériences ainsi réalisées font appel à des concentrations de l'ordre du mM provoquant vraisemblablement des effets non-physiologiques. Considérant l'activité phosphodiestérase élevée chez certains végétaux, Li *et al.* (1994) ont suggéré que celle-ci pouvait dégrader une partie de l'AMPc exogène et diminuer ainsi les doses effectivement en contact avec les cellules étudiées. Li *et al.* (1994) ont observé que des concentrations d'AMPc comprises entre 50 nM et 5 µM permettaient d'induire une augmentation significative d'un courant d'ions K^+ de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule,

uniquement s'ils ajoutaient en même temps un inhibiteur de phosphodiestérase (PDE). L'activité de cette PDE pourrait expliquer en partie les difficultés rencontrées pour doser l'AMPc dans les cellules végétales. Enfin, Tezuka *et al.* (1993) ont montré que l'application de 10 nM en AMPc était suffisante pour induire la croissance de tubes polliniques chez le lis. Cette concentration est en accord avec les dosages effectués par Ishioka & Tanimoto (1990) et par Gangwani *et al.* (1991).

De tout ce qui précède, nous pouvons conclure qu'il est nécessaire:

-de poursuivre les dosages de l'AMPc dans un maximum d'espèces végétales en tenant compte des variations possibles développées ci-dessus;

-de rechercher des enzymes végétales impliquées dans la synthèse et la dégradation de l'AMPc;

-d'identifier chez les plantes des protéines régulées par l'AMPc, présentant des ressemblances avec des protéines animales et impliquées dans la voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc.

C) Les intermédiaires hypothétiques d'une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les Plantes.

1.- Protéines G végétales (Verhey & Lomax, 1993).

L'intervention de protéines G dans la régulation de différents phénomènes dans les cellules végétales ne fait aucun doute. Trois approches ont été utilisées pour la mise en évidence des protéines G végétales:

- une approche pharmacologique à l'aide d'activateurs (mastoparan, toxine du choléra et GTPγS[5]) et d'inhibiteurs (GDPβS, toxine pertussique) des protéines G animales (Bossen *et al.*, 1990; Fairley-Grenot & Assmann, 1991; Legendre *et al.*, 1992);
- une approche immunologique faisant appel à des anticorps dirigés contre des motifs conservés parmi les protéines G animales (Warpeha *et al.*, 1991);
- une approche génétique ayant pour but l'identification de gènes végétaux codant pour des protéines homologues aux protéines G mammaliennes. Ma *et al.* (1990) ont isolé un gène d'*Arabidopsis thaliana*, GPA1, codant pour une protéine, GPα1, homologue aux sous-unités α des protéines G mammaliennes. Les comparaisons de séquences donnent des résultats tout à fait intéressants puisqu'il y a 73 % de similarités dont 36 % d'identités entre GPα1 et les sous-unités α inhibitrices des

---

[5]Le GTPγS est un analogue non-hydrolysable du GTP: les S.U. α qui fixent le GTPγS sont actives en permanence.

protéines G mammaliennes. GPα1 possède en outre une arginine en position 190 qui serait un site potentiel d'ADP-ribosylation par la toxine du choléra, comme c'est le cas chez toutes les sous-unités α des protéines G animales déjà connues.

2.- Mise en évidence d'une activité adénylate cyclase et d'une activité phosphodiestérase.

A ce jour, aucun gène végétal codant pour une adénylate cyclase (AC) ou une phosphodiestérase (PDE) n'a encore été cloné. De plus ces deux protéines n'ont pas été suffisamment purifiées pour permettre de les microséquencer ni pour autoriser une caractérisation enzymatique fine (Assmann, 1995).
Cependant, plusieurs équipes ont pu mettre en évidence une activité adénylate cyclase et/ou une activité phosphodiestérase chez certains végétaux.
Carricarte *et al.* (1988) ont observé une activité adénylate cyclase chez la luzerne (*Medicago sativa*).
Gromes & Zetsche (1992) ont mesuré une activité AC dans un homogénat de cellules du phytoflagellé *Chlorogonium*. Après avoir séparé leur homogénat en une fraction de protéines solubles et en une fraction membranaire, plus de 80 % de l'activité se retrouvait dans la fraction contenant les protéines membranaires, ce qui est en concordance avec ce que l'ont sait des AC mammaliennes. Un autre argument, qui tendrait à prouver qu'il s'agit bien d'une adénylate cyclase, est venu de l'observation que le GTPγS stimulait fortement l'activité qu'ils dosaient, mettant en évidence la participation éventuelle d'une protéine G située plus en amont. En effet il a été montré chez les cellules animales que le GTPγS, un analogue non-hydrolysable du GTP, activait les protéines G de façon permanente. En parallèle, ils ont aussi révélé la présence d'une activité PDE régulée par le système Ca^{2+}/calmoduline qui se retrouvait dans la fraction soluble de leur homogénat.
Tezuka *et al.* (1993) ont mis en évidence l'existence d'un système AC/PDE chez le lis. L'adjonction de forskoline (activateur de l'activité AC) et d'IBMX[6] (inhibiteur de l'activité PDE) fait augmenter la concentration intracellulaire en AMPc et induit la croissance des tubes polliniques.

3.- Y a-t-il des équivalents à la PKA chez les cellules végétales?

Plusieurs équipes ont tenté de faire la preuve de l'existence de PKA végétales en employant divers moyens:

---

[6]IBMX, 3-isobutyl-1-méthylxanthine.

- des ADNc codant pour des protéines homologues aux sous-unités catalytiques des protéines kinases animales de type sérine / thréonine ont été isolés chez de nombreuses espèces végétales (Lawton *et al.*, 1989; Biermann *et al.*,1990; Hayashida *et al.*, 1993). Ces trois laboratoires ont utilisé des sondes oligonucléotidiques dont les séquences correspondent aux motifs DLKPEN et GTPEYLAPE conservés au sein des Ser/Thr-PK's, famille de kinases animales à laquelle la PKA et la PKC appartiennent. Cependant aucune étude testant la fonction des produits de ces ADNc n'a encore été réalisée.
- à partir de cellules d'*Euglena gracilis*, Carre & Edmunds (1992) ont séparé par chromatographie deux protéines liant l'AMPc avec une forte affinité. Ils ont testé l'activité kinase de ces protéines partiellement purifiées et ont montré qu'elles étaient toutes les deux capables de phosphoryler un peptide artificiel, le Kemptide (LRRASLG), dont on a montré chez les cellules animales qu'il était un substrat privilégié pour la PKA.
- l'utilisation d'inhibiteurs (PKI[7] et Rp-cAMP-S[8]) de la PKA animale sur des protoplastes de *Vicia faba* provoquant la diminution d'un courant K^+ AMPc-dépendant a permis de révéler la participation d'une PKA-like végétale dans la régulation de ce phénomène. En l'absence d'AMPc exogène, la perfusion des protoplastes avec la S.U. catalytique de la PKA, extraite de cellules animales, provoque une augmentation du courant potassique, ce qui tend à confirmer l'intervention d'une PKA végétale (Li *et al.*, 1994).

4.- Identification de facteurs de transcription végétaux homologues à la famille CREB/ATF.

S'il existe une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez les cellules végétales, il devrait exister, comme chez les animaux, des facteurs de transcription de type CREB dont l'activité serait régulée par l'AMPc.
Depuis 1989 différents indices se sont accumulés en faveur de l'existence de protéines CREB-like chez les végétaux:
- plusieurs ADNc codant pour des protéines végétales possédant un domaine b-Zip ont été clonés et séquencés (tableau 1). L'analyse comparative de leurs

---

[7]le "Walsh inhibitor" ou PKI (PKA inhibitor) est un peptide qui reconnaît spécifiquement la S.U. catalytique de la PKA et l'inhibe.

[8]l'adénosine 3', 5' -phosphothioate, un antagoniste de l'AMPc, entre en compétition avec ce dernier pour les sites de liaison portés par la S.U. régulatrice de la PKA.

b-Zip végétales	Espèce	Références	Séquences-cible[1]	Régulation de la transcription[2]	Dimérisation[3]
TGA1a TGA1b	Tabac	Katagiri *et al.* (1989)	TG**ACGT** CC**ACGT**CA TG**ACGT**	transactivateur	
HBP-1a et HBP-1b	Blé	Tabata *et al.* (1989 et 1991)	**ACGT**CA		homodimères pas d'hétérodimères
VBP1	*Vicia faba*	Ehrlich *et al.* (1992)	TG**ACGT**CA		
TGA's	*Arabidopsis thaliana*	Miao et al. (1994)	TG**ACGT**C		
O2 (Opaque 2)	Maïs	Hartings *et al.* (1989) Schmidt *et al.* (1990) Lohmer et al. (1991)	G-box ou C-box	transactivateur	
EmBP1	Blé	Guiltinan *et al.* (1990)	C**ACGT**GGC		
TAF-1	Tabac	Oeda *et al.* (1991)	GT**ACGT**GGCG GCC**ACGT**GGC	transactivateur	
CPRF's	Persil	Armstrong *et al.* (1992)	CC**ACGT**GGCC GT**ACGT**GG		homodimères et hétérodimères

Tableau 1: b-Zip protéines végétales.

---

[1] les séquences-cibles contiennent un motif central ACGT suivi en 3' par un C (C-Box) ou par un G (G-Box).

[2] les cases vides indiquent qu'aucune expérience tendant à mettre en évidence la transactivation n'a été réalisée.

[3] les cases vides indiquent qu'aucune expérience n'a été realisée pour montrer la dimérisation.

séquences a montré que ces protéines étaient homologues entre elles et pourraient former une famille de protéines b-Zip végétales.

- pour certaines d'entre elles on a montré *in vitro* et/ou *in vivo* qu'elles étaient transactivatrices (tableau 1).

- les séquences-cible de ces facteurs contiennent pour la plupart un motif central ACGT, suivi en 3' par un G ou par un C: on parle de G-box et de C-box respectivement (tableau 1). Remarquons que le motif ACGTC se retrouve intégralement au niveau du cAMP-response element (CRE) chez les animaux.

- deux de ces b-Zip protéines, TGA1a du tabac et VBP1 de *Vicia faba*, sont plus particulièrement intéressantes (Katagiri *et al.*, 1989; Ehrlich *et al.*, 1992):

1°) les séquences cis reconnues par TGA1a (TGACG et CCACGTCA) et VBP1 (TGACGTCA) sont très proches voire identiques au CRE.

2°) leurs domaines b-Zip respectifs présentent une homologie importante avec les protéines b-Zip animales, CREB, c-Fos et c-Jun. Le pourcentage de similarités avec CREB est supérieur aux pourcentages obtenus avec Fos et Jun.

3°) l'activité de liaison à l'ADN de VBP1 est sensible à la méthylation des cytosines au niveau de sa séquence-cis comme cela été montré pour CREB.

4°) des expériences de compétition montrent que la séquence-cible de c-Fos et c-Jun (TGACTCA) n'est pas reconnue par VBP1.

Tous ces indices permettent de penser qu'il existe effectivement des protéines de type CREB chez les végétaux, mais il n'a jamais été montré que ces protéines étaient activées par une voie dépendante de l'AMPc. Pour ce faire, il faudrait réaliser des études fonctionnelles permettant de relier l'AMPc, les facteurs de transcription et les gènes régulés par cette voie.

Chapitre 2. OBJECTIFS

Dans le cadre de l'étude des voies de transduction du signal permettant la réponse cellulaire à une attaque pathogène, il a été postulé au laboratoire qu'une de ces voies dépendrait de l'AMPc (Messiaen, 1994). La transduction du signal dépendante de l'AMPc est encore peu connue chez les cellules végétales, contrairement aux cellules animales. Nous nous sommes intéressés à la partie la plus en aval de la voie: les facteurs de transcription. Dans le chapitre précédent nous avons vu qu'il existait toute une famille de facteurs de transcription en b-Zip chez les végétaux, mais que leur dépendance vis-à-vis de l'AMPc n'a pas encore été démontrée.

L'objectif de ce mémoire est de cloner et de caractériser un gène de facteur de transcription homologue à la protéine mammalienne CREB dans l'une des espèces végétales étudiées au laboratoire. Ultérieurement ce gène servira à réaliser des tests visant à relier l'AMPc à la régulation de l'expression de gènes végétaux.

Pour atteindre ce but, le clonage sera tenté chez *Arabidopsis thaliana*[9] et *Cichorium intybus* (chicorée) dont les conditions de culture *in vitro* sont bien maîtrisées au laboratoire.

La stratégie employée avec *Arabidopsis thaliana* consistera à identifier dans une banque d'expression un gène codant pour une protéine capable de se lier à une sonde nucléotidique CRE (cAMP-Response Element). La ressemblance de cette protéine avec la CREB mammalienne et d'autres facteurs de transcription d'origine végétale pourra ensuite être vérifiée par des comparaisons de séquences.

La stratégie utilisée avec *Cichorium intybus* consistera à amplifier par PCR le gène d'intérêt à partir d'ADNc disponible au laboratoire. Les primers oligonuclétidiques seront synthétisés sur base de séquences très conservées (domaine b-Zip) au sein de plusieurs protéines végétales homologues à la CREB mammalienne.

---

[9] *A. thaliana* possède le plus petit génôme végétal.

Chapitre 3 . RESULTATS ET DISCUSSIONS.

I) Tentative de clonage chez *Arabidopsis thaliana.*

Cette première stratégie impliquait la construction d'une banque d'expression d'ADNc d' *A.thaliana* au départ de graines aimablement fournies par "the Nottingham Arabidopsis Stock Centre" (Nottingham, UK).

A) Germination et culture *in vitro* de graines d'*Arabidopsis thaliana.*

Une première étape consistait à provoquer la germination de ces graines, préalablement stérilisées dans de l'eau de Javel, sur milieu M&S riche en sels minéraux et en vitamines. Au bout d'une semaine de culture en chambre thermostatisée à 25°C, les embryons ont été repiqués stérilement dans des boîtes plus hautes afin de favoriser la pousse en hauteur (accroissement de la masse). Deux semaines de culture ont été nécessaires pour obtenir des plantules de taille suffisante (une dizaine de cm).
Les plantules ont été prélevées dans leur entièreté et congelées immédiatement dans l'azote liquide à -196°C. Une masse totale de matériel d'environ 30 g a ainsi été obtenue et stockée à -70°C.

B) Extraction d'ARN total.

1.- Broyage des cellules.

Au cours de cette étape, il est particulièrement nécessaire de protéger l'ARN de l'action des RNases libérées de la vacuole. C'est pourquoi les cellules sont broyées directement dans l'azote liquide (-196°C), afin d'inhiber par le froid l'activité enzymatique. Le broyage est réalisé au moyen d'un mortier et d'un pilon préalablement refroidis à -70°C.

2.- Extraction au chlorure de lithium.

Après broyage des cellules, l'ARN doit être extrait dans un tampon qui le préserve de l'action des RNases. L'extraction au chlorure de lithium (modifié de De Vries *et al.*, 1988) utilise un tampon chauffé à 90°C, contenant du phénol et de l'EDTA[10] (agent chélatant des cations bivalents), à pH 9. Le tampon chaud est versé sur la poudre afin que les cellules dégèlent directement dans des conditions protectrices. Le chlorure de lithium à une concentration de 2 M est utilisé pour

---

[10]l'utilisation d'EDTA permet d'inhiber en partie l'activité des RNases qui nécessitent des cations bivalents pour être pleinement fonctionnelles.

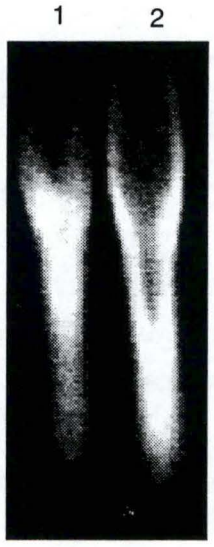


Figure 19: électrophorèse en gel d'agarose d'ARN total d'*Arabidopsis thaliana* après extraction au LiCl.
piste 1: 30 mg de matériel déposé
piste 2: 50 mg de matériel déposé
Le profil en "fer de lance" est caractéristique d'une contamination par les polysaccharides.

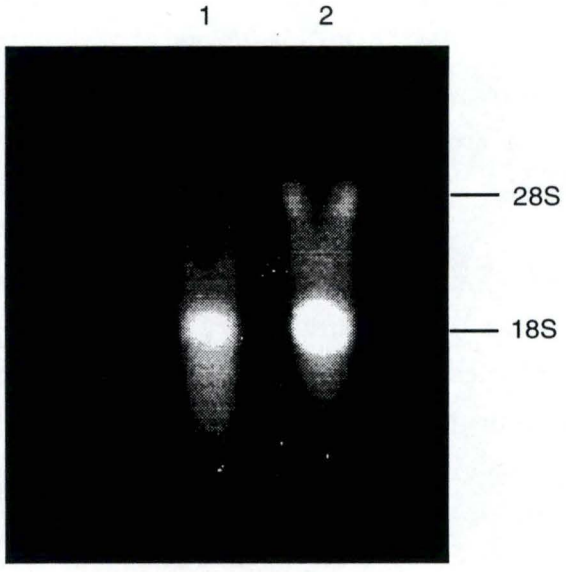


Figure 20: extraction d'ARN total au LiCl suivie d'un gradient de CsCl.
piste 1: 30 mg déposés
piste 2: 50 mg déposés
Le profil en "fer de lance" est conservé.
On commence à distinguer les bandes deux bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 18s et 28S.

faire précipiter spécifiquement l'ARN. L'ADN ne précipite qu'à des concentrations supérieures.

L'ARN total extrait est dosé à 260 nm. Par exemple, lors d'une extraction réalisée à partir de 6 gr d'*A. thaliana*, nous avons obtenu 840 µg d'ARN. La figure 19 montre le profil de migration obtenu avec 50 µg de l'échantillon. Ce profil en "fer de lance" est caractéristique d'une contamination par des polysaccharides provenant de la paroi végétale; l'obtention d'un pic important d'absorption à 190 nm confirme la présence d'impuretés dans l'échantillon, parmi lesquelles une majorité de polysaccharides.

La présence de polysaccharides est gênante lors de l'étape ultérieure de purification des ARN messagers. En effet, l'échantillon est déposé sur une colonne de chromatographie d'affinité. Celle-ci peut rapidement être obstruée par des échantillons insuffisamment purifiés. Nous avons donc cherché à éliminer les polysaccharides d'une manière plus efficace.

Une première modification de la méthode a consisté à effectuer à la fin du protocole une étape de précipitation des polysaccharides végétaux à l'éthanol, comme préconisé par Michaels *et al.* (1994). Les polysaccharides devraient en effet précipiter à une concentration finale en éthanol de 35 %, alors que la concentration requise pour précipiter l'ARN est plus élevée. La précipitation à l'éthanol n'a cependant pas été suffisante dans notre cas: le profil en "fer de lance" était conservé.

3.- Extraction au chlorure de litihum suivi par un gradient au chlorure de césium.

Une variante de l'extraction au chlorure de lithium consiste à séparer l'ARN des autres constituants cellulaires dans un gradient de chlorure de césium (Sambrook *et al.*, 1989). En effet, la densité de l'ARN dans le CsCl étant supérieure à celle des autres constituants, il est possible de les séparer par centrifugation. Le profil de migration obtenu par cette technique est illustré à la figure 20 et l'on voit que l'aspect en "fer de lance" est atténué mais toujours présent. On commence à distinguer les deux bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 18S et 28S, cependant les traînées observées sous les bandes attestent de la dégradation de l'ARN.

4.- Extraction au TRIzol™ Reagent.

Suite aux problèmes rencontrés lors de l'extraction au chlorure de lithium, nous nous sommes orientés vers une nouvelle technique utilisant un réactif appelé TRIzol™ (GIBCO BRL). Ce réactif nous a permis d'obtenir des échantillons plus purs et moins dégradés que les précédents (voir figure 21).

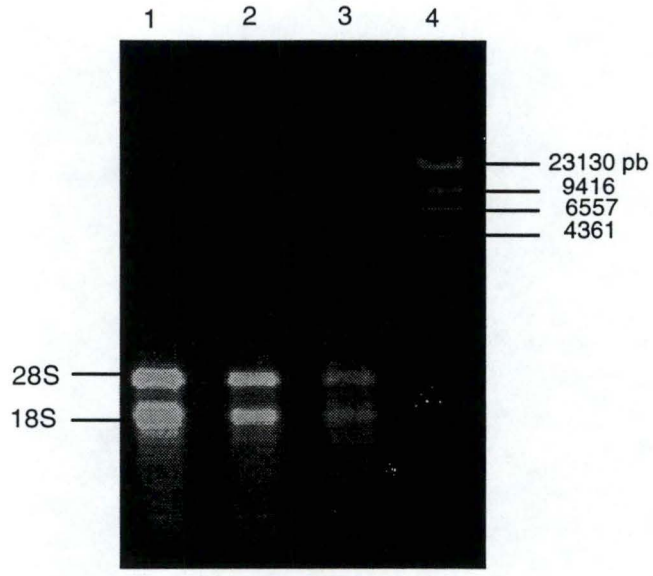


Figure 21: Extraction d'ARN total au Trizol Reagent.
piste 1: 4 mg déposés
piste 2: 2 mg déposés
piste 3: 1 mg déposés
piste 4: marqueur de taille l ADN/*Hin*d III.

C) Purification des ARN messagers.

Aucune des méthodes d'extraction d'ARN total que nous avons essayées ne nous a permis d'obtenir un échantillon dépourvu de polysaccharides. Néanmoins, nous avons décidé de tenter la purification des ARN messagers sur colonne oligo-dT avec les échantillons provenant des extractions au TRIzol™.

Les ARN messagers sont purifiés par chromatographie d'affinité grâce au fait qu'ils possèdent une queue de poly-A à leur extrémité 3'. Des bras poly-T fixés de manière covalente à une colonne de cellulose lient les queues de poly-A et retiennent ainsi les ARNm. L'hybridation des queues de poly-A aux bras poly-T est favorisée par des concentrations en NaCl comprises entre 0.3 et 0.5 M.
Après rinçage de la colonne (pour éliminer tous les ARN non-messagers), les ARNm sont élués en utilisant un tampon dépourvu de NaCl, ce qui déstabilise les hybrides poly-A/poly-T. Afin d'obtenir une préparation d'ARN enrichie à plus de 90 % en ARNm, il est conseillé d'effectuer un deuxième passage de l'échantillon sur la colonne.
Lorsque nous avons suivi intégralement le protocole fourni avec les colonnes oligo dT (GIBCO BRL), un ralentissement du débit de la colonne a été observé avant que celle-ci ne se bouche complètement.
Normalement le débit de la colonne, qui est de l'ordre de 6 gouttes/minute lors des rinçages préliminaires, ne devrait pratiquement pas ralentir lors du dépôt de l'échantillon. Dans notre cas, lors du premier passage de l'échantillon, le débit chute rapidement à 1 goutte/minute pour devenir quasi nul au cours du second passage.
Pour tenter de remédier à ce problème, nous avons fait passer sur la colonne du tampon chaud entre les deux élutions afin de resolubiliser et d'éliminer les polysaccharides accumulés dans les mailles du gel de cellulose. La colonne a ainsi pu être débouchée, mais les mesures d'absorbance à 260 nm que nous avons effectuées pour mettre en évidence les ARNm dans nos échantillons se sont révélées pratiquement nulles.
Une hypothèse expliquant l'absence d'ARNm dans l'éluat proviendrait du fait que les polysaccharides présents dans les échantillons déposés sur colonne pourraient être responsables d'une diminution de l'activité ionique dans le tampon en fixant les cations. La salinité réelle dans l'échantillon serait dès lors inférieure à 0.3 M, empêchant ainsi les ARNm de se lier aux bras poly-T.
A titre indicatif, à partir de 2 mg d'ARN total déposé sur la colonne, nous aurions dû récupérer entre 20 et 100 µg d'ARNm si l'on considère que les ARNm constituent entre 1 et 5% de la population totale. Les fabricants de la colonne

indiquent qu'il faut au moins 20 mg d'ARN total pour dépasser la capacité de la colonne, ce qui n'a jamais été notre cas.

D) Conclusion.

L'élimination des polysaccharides est une étape délicate de la purification des ARN messagers. Malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes pas parvenus à purifier correctement les ARN messagers d'*A. thaliana*. Nous avons en conséquence décidé d'abandonner celle-ci pour nous tourner vers le modèle *Cichorium intybus* (chicorée), manipulé depuis plus longtemps au laboratoire.

II) Clonage d'une b-Zip protéine homologue à CREB chez *Cichorium intybus.*

A) Introduction.

Nous avons travaillé sur de l'ADNc obtenu au laboratoire par JP Goblet dans le cadre d'une étude sur le métabolisme des sucres dans la chicorée.
Etant donné la forte homologie existant entre les protéines b-Zip provenant de diverses espèces végétales, l'utilisation d'amorces choisies parmi les régions les plus conservées devrait nous permettre d'amplifier chez la chicorée un gène codant pour une nouvelle protéine de type b-Zip. L'analyse de sa séquence nous fournira des renseignements sur la ressemblance de cette protéine avec les autres b-Zip végétales ainsi qu'avec CREB.

B) L'ADNc de chicorée.

La population d'ADNc non-clonés a été construite à l'aide du Marathon cDNA Amplification Kit (PT1115-1) de CLONTECH. Il a fallu extraire l'ARN total de chicorée et purifier les ARN messagers. La synthèse des ADN double-brin complémentaires des ARNm a ensuite été effectuée en deux étapes: le premier brin d'ADN est d'abord synthétisé, grâce à un primer oligo dT et à la Reverse Transcriptase isolée du MMLV (Moloney murine leukemia virus). La deuxième étape consiste en l'action simultanée de trois enzymes: une ribonucléase qui sert à digérer le brin d'ARNm hybridé à l'ADN néosynthétisé, une ADN polymérase I et une ligase qui lie entre eux les fragments du second brin nouvellement synthétisé.
Des adaptateurs identiques ont été ligués aux deux extrémités des ADNc: ceux-ci permettent de procéder à l'amplification des extrémités 5' et 3' des ADNc.

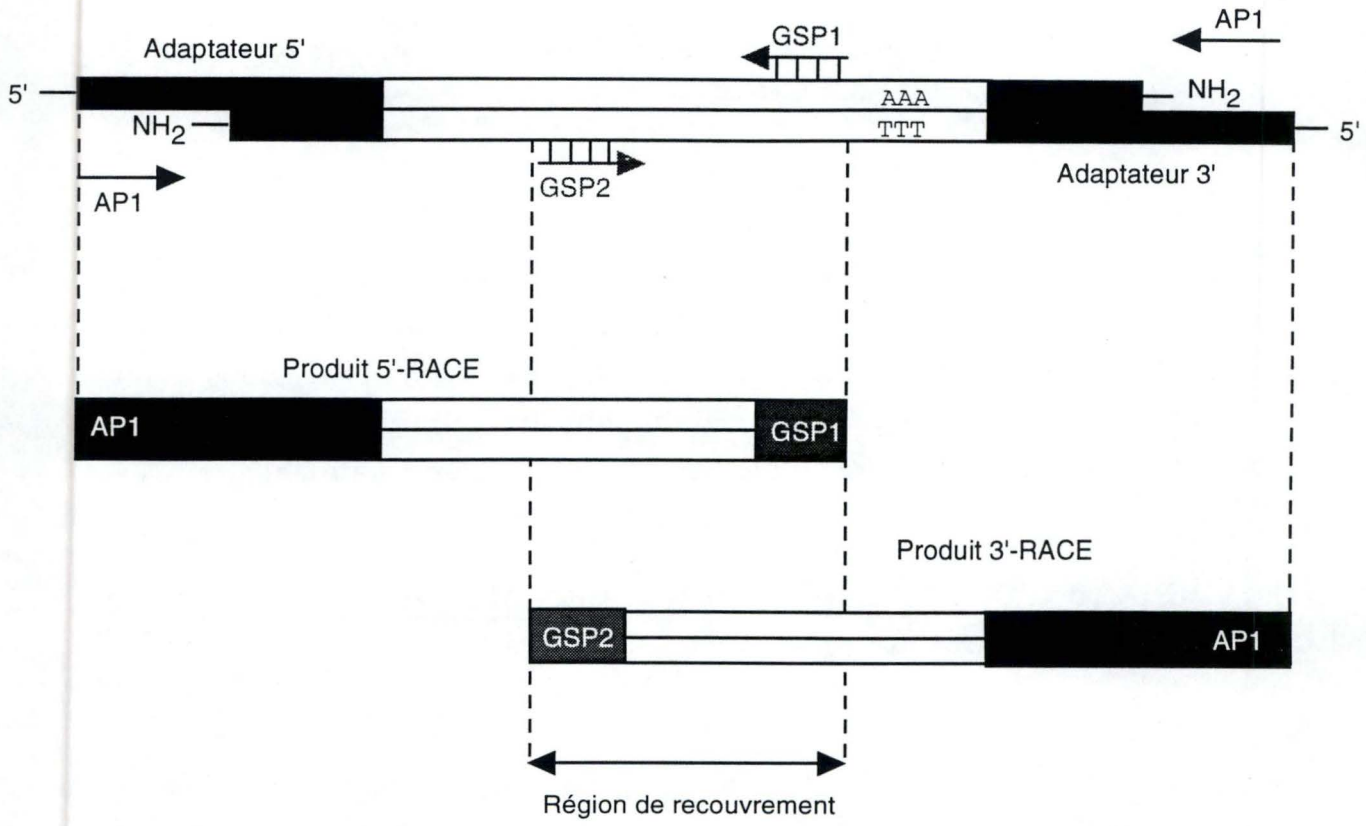


Figure 22: Schéma général d'un ADNc avec ses adaptateurs 3' et 5' et les produits 5'- et 3'-RACE attendus.

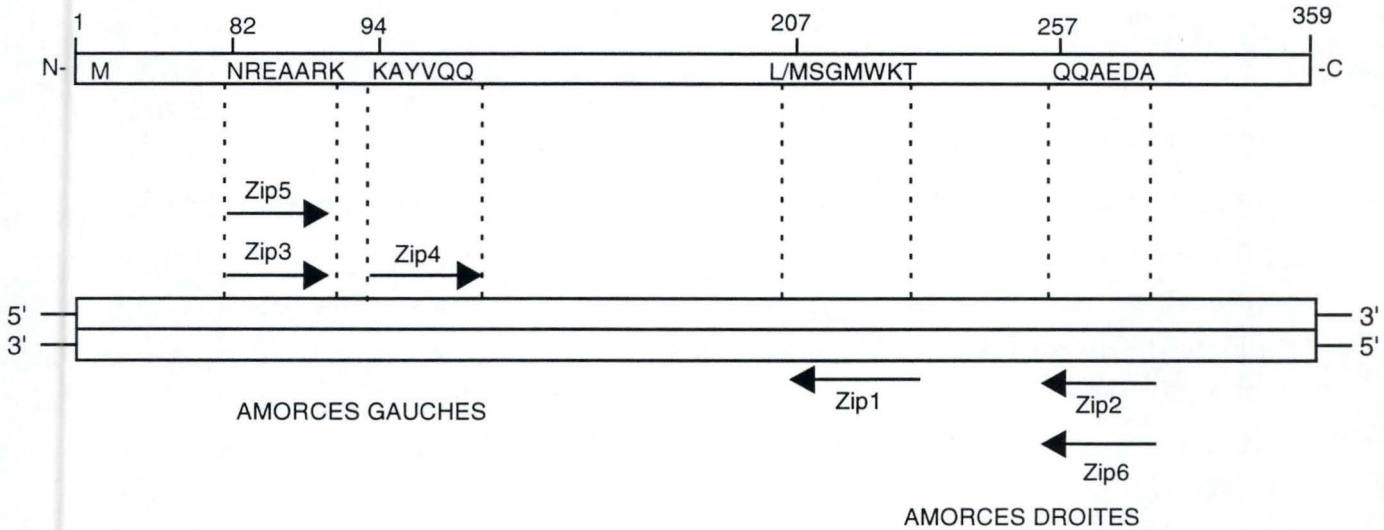


Figure 23: orientation des amorces Zip's sur base de la séquence en acides aminés de TGA1a (359 aa).

C) Amplification par 5'- et 3'-RACE PCR (Rapid Amplification of 5'- and 3'-cDNA Ends).

1.- Principe de la méthode.

La 5'-RACE consiste à amplifier un fragment d'ADNc compris entre un primer AP1 qui se liera au niveau de l'adaptateur 5'[11]et un primer spécifique du fragment d'intérêt (gene specific primer, GSP1) (figure 22).
Le fragment amplifié lors de la 3'-RACE est compris entre le primer AP1 lié au niveau de l'adaptateur 3' et le GSP2 (figure 22).
Les adaptateurs sont particuliers à deux points de vue:
1°) leur extrémité 5' protrudante contient une séquence identique (mais non-complémentaire) au primer AP1;
2°) leur extrémité 3', en retrait par rapport à leur extrémité 5', n'offre pas de site de liaison pour le primer AP1 et contient un groupe NH_2 terminal qui empêche l'extension de cette extrémité.
Dès lors la seule manière d'amplifier un fragment compris entre les deux primers AP1 et GSP1 consiste à créer un site de liaison pour AP1 par polymérisation depuis le GSP1 au cours du premier cycle d'amplification (figure 24).

2.- Choix des Gene Specific Primers (GSP's).

Les amorces PCR ont été choisis sur base des alignements de séquences réalisés entre TGA1a, VBP1 et CREB (Ehrlich *et al.*, 1992).
Zip5, Zip3 et Zip4 sont des amorces gauches tandis que Zip1, Zip2 et Zip6 sont des amorces droites (figure 23):
- **Zip5** (dégénéré 64 X) correspond à un motif NREAARK conservé entre TGA1a, VBP1 et CREB. Ce motif est situé dans la région basique du domaine de liaison à l'ADN et est en outre conservé parmi d'autres b-Zip végétales.
- **Zip3** est dégénéré 4096 X et s'hybride au niveau du motif REAARK.
- **Zip4** (dégénéré 256 X) correspond à un motif KAYVQQ conservé entre TGA1a et VBP1 et situé juste en amont de la première leucine appartenant à la leucine-zipper. On retrouve aussi ce motif chez HBP-1b.
- **Zip1** (dégénéré 4096 X) correspond à un motif (M/L)SGMWKT conservé entre TGA1a et VBP1.
- **Zip2** (dégénéré 256 X) correspond à un motif QQAEDA conservé dans le domaine carboxy-terminal des b-Zip protéines végétales.

---

[11]Par définition, l'adaptateur 3' est situé du côté de la queue poly-(AT) de l'ADNc. L'adaptateur du côté opposé est appellé adaptateur 5'.

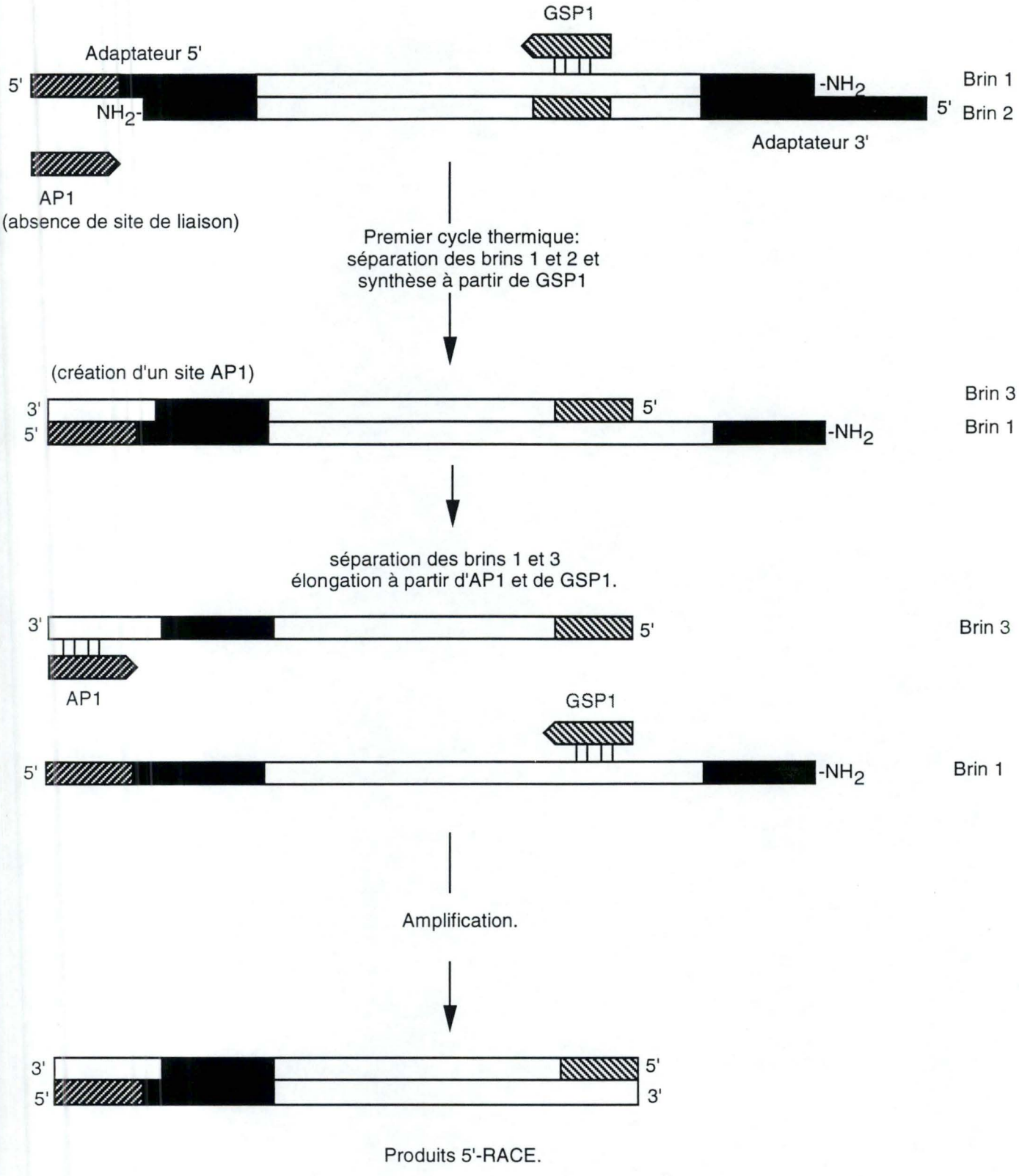


Figure 24: Déroulement général d'une 5' RACE (Rapid Amplification of 5' cDNA Ends).

- **Zip6** correspond à Zip2 tout en n'étant dégénéré que 4 X.

Des sites de restriction ont été introduits à l'extrémité 5' des amorces afin de faciliter un éventuel clonage ultérieur. Le tableau ci-dessous reprend toutes les informations utiles concernant les 6 amorces.

Amorce	Séquences nucléotidiques	Site de restriction	Tm (C°)	taux de dégénérescence
Zip5	5'-GG-**AAG-CTT**-AAY-CGY-GAG-GCW-GCW-MGW-AAA-3'	Hind III	57.1	64
Zip3	5'-GG-**GAA-TTC**-MGN-GAR-GCN-GCN-MGN-AAR-3'	Eco RI	57.6	4096
Zip4	5'-GG-**GAA-TTC**-AAR-GCN-TAY-GTN-CAR-CAR-3'	Eco RI	52.9	256
Zip1	5'-GG-**AAG-CTT**-NGT-YTT-CCA-CAT-NCC-NSW-NAR-3'	Hind III	56.4	4096
Zip2	5'-GG-**AAG-CTT**-NGC-RTC-YTC-NGC-YTG-YTG-3'	Hind III	57.6	256
Zip6	5'-GG-**GAA-TTC**-SGC-GTC-TTC-TGC-TTG-YTG-3'	Eco RI	56.8	4

Les codes de dégénérescence sont les suivants: Y (C ou T), W (A ou T), M (A ou C), N (A, C, G ou T), R (A ou G), S (G ou C).

3.- *Résultats des réactions de 5'- et 3'-RACE.*

a) Mise au point des conditions d'amplification.

Nous avons choisi une température d'hybridation (45°C) peu élevée. Cette température se justifiait par les T_m[12] relativement bas de nos GSP's. Nous avons ainsi voulu favoriser leur accrochage sur l'ADNc quitte à courir le risque d'hybridations non-spécifiques, risque encore augmenté par la nature dégénérée de certains des primers. Un moyen d'éliminer les bandes résultant d'une hybridation non-spécifique consiste à augmenter la température d'hybridation lors d'une nouvelle amplification: le(s) fragment(s) disparaissant lors de cette amplification sont considérés comme non-spécifiques.

Il a aussi fallu établir le nombre optimal de cycles d'amplification: c'est pourquoi nous avons prélevé 10 µl de mélange PCR après 25, 30, 35 et 40 cycles. Ces prélèvements ont été effectués à la fin des phases d'élongation (68°C) correspondantes.

---

[12]Par définition, le T_m (température de melting) est la température à laquelle 50% de l'ADN est réversiblement dénaturé. Le T_m est déterminé, entre autres, par la proportion de G et de C présents dans la double-hélice.

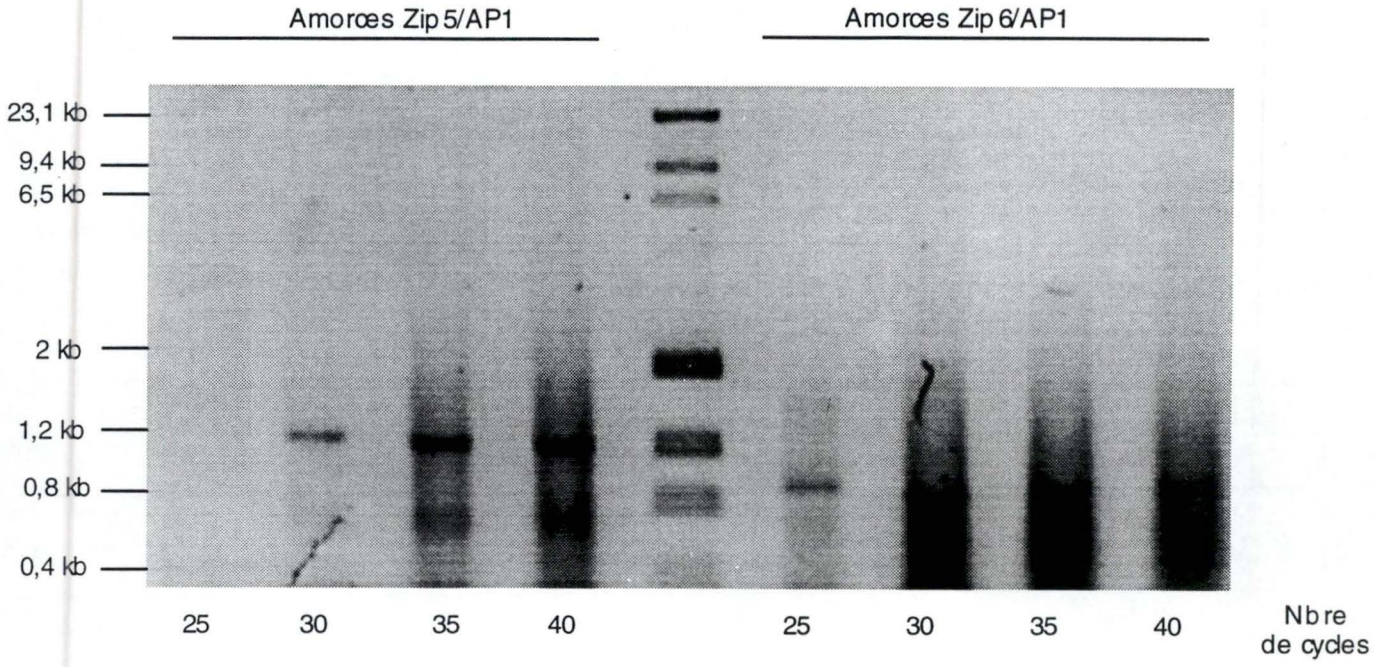


Figure 25: 3'-RACE avec l'amorce Zip5 (2 µM)et 5'-RACE avec l'amorce Zip6 (2 µM). Dans chaque puit, on a déposé 10 ml du mélande PCR.

Une première série d'amplifications a été réalisée en se basant sur la concentration en GSP conseillée par le Kit, à savoir 0.2 µM. Aucune bande n'a été obtenue lors de ces amplifications. Un nouvel essai a été réalisé en augmentant d'un facteur dix la concentration en GSP.

b) Résultats obtenus avec une concentration en GSP de 2 µM.

Les 10 µl prélevés à chaque cycle ont été déposés sur gel d'agarose 1%.
Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus avec les différents GSP's:

Primer	après 25 cycles	après 30 cycles	après 35 cycles	après 40 cycles
Zip1	néant	début de traînée	traînée prononcée	traînée prononcée
Zip2	4 bandes (0.3, 0.5, 0.9, et 1.6 kb).	traînée qui atténue les bandes	traînée prononcée	traînée prononcée
Zip3	néant		néant	néant
Zip4	néant	faible traînée 2 bandes (0.7 et 1.1 kb).	traînée prononcée	traînée prononcée
Zip5	néant	2 bandes (0.75 et 1.2 kb).	intensification des 2 bandes apparition d'une légère traînée	intensification des 2 bandes intensification de la traînée
Zip6	1 bande à 0.9 kb	1 bande à 0.9 kb importante traînée	1 bande à 0.9 kb importante traînée	1 bande à 0.9 kb importante traînée

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux bandes amplifiées par Zip5 et Zip6 (figure 25). Ces amorces étant les moins dégénérées parmi les six Zip's, il y a de fortes chances pour que les bandes qu'elles permettent d'amplifier soient le résultat d'une hybridation spécifique.
Remarquons que la bande à 0.9 kb se retrouve dans les profils de migration obtenus avec Zip2 et Zip6, ce qui est en concordance avec le fait que Zip2 est semblable à Zip6 tout en étant plus dégénéré.
Il est étonnant qu'aucune bande n'ait été amplifiée avec Zip3, étant donné sa similarité avec Zip5 et sa dégénérescence plus grande. L'absence de traînée au niveau du gel nous suggère qu'il s'agit d'un problème technique.

c) Origine des bandes multiples.

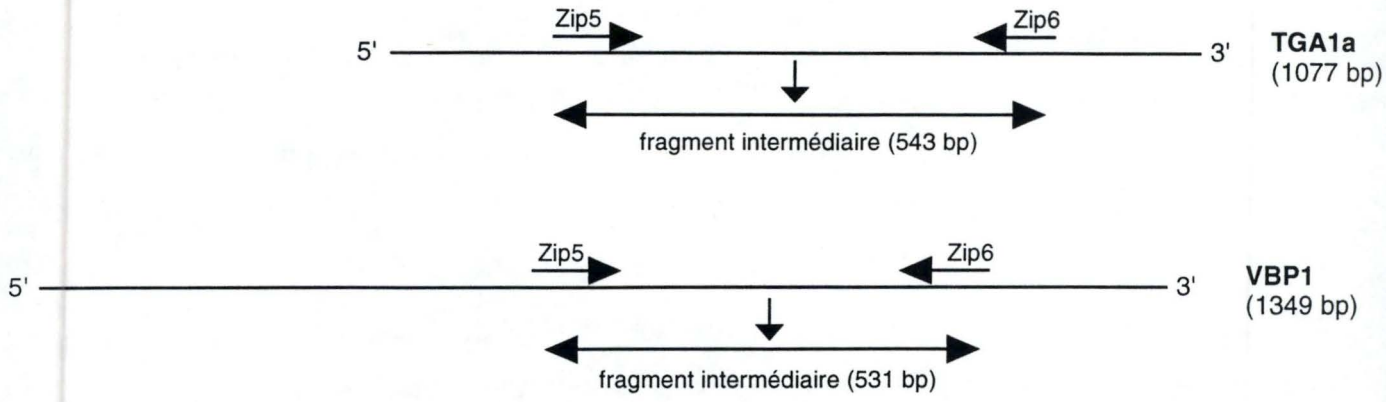


Figure 26: taille des fragments compris entre Zip5 et Zip6 chez TGA1a et VBP1.

Il y a deux types de causes qui expliquent l'amplification de bandes multiples à partir d'un même primer.

Des causes artéfactuelles donnent naissance à des produits d'amplification incomplets ou non-spécifiques.
Les produits incomplets peuvent être obtenus suite à la dégradation de l'ARNm utilisé pour synthétiser l'ADNc. Il peuvent aussi être le résultat d'un disfonctionnement de la transcriptase inverse qui s'arrêterait avant la fin de la synthèse du premier brin d'ADNc, et cela d'autant plus que l'ARNm de départ est long. Dans les deux cas on aboutit à une population mixte d'ADNc: des ADNc entiers et des ADNc de taille réduite.
Les produits non-spécifiques sont provoqués par l'hybridation non-spécifique du primer en différents sites des ADNc. La température basse d'hybridation (45°C) , la concentration élevée en primer (2 µM) et le taux de dégénérescence important du primer sont trois facteurs qui favorisent l'hybridation non-spécifique.

Des causes réelles peuvent expliquer la présence de bandes multiples.
Un même gène peut donner naissance à des transcrits de tailles différentes suivant trois mécanismes:
- l'épissage alternatif;
- l'utilisation de différents sites d'initiation de la transcription;
- l'utilisation de différents sites de polyadénylation.

Les deux premiers mécanismes peuvent générer de multiples fragments 5' et 3' tandis que le troisième ne donne lieu qu'à des fragments multiples 3'.
Enfin, l'existence de familles multi-géniques peut expliquer qu'un primer dit "gene specific" amplifie simultanément plusieurs ADNc homologues.

D) Contrôles des amplifications avec Zip5 et Zip6.

Un contrôle négatif a été réalisé en procédant à deux amplifications, effectuées dans les mêmes conditions que précédemment, mais en utilisant Zip5 et Zip6 seuls, sans le primer AP1. Aucun fragment ne devrait être amplifié au cours de ces deux réactions.
Un deuxième contrôle, positif, utilisant Zip5 et Zip6 dans la même réaction devrait permettre d'amplifier un fragment correspondant à la séquence interne comprise entre ces deux amorces. L'analyse des séquences de TGA1a et de VBP1 donne pour ce fragment interne des tailles respectives de 543 et 531 paires de bases (figure 26).

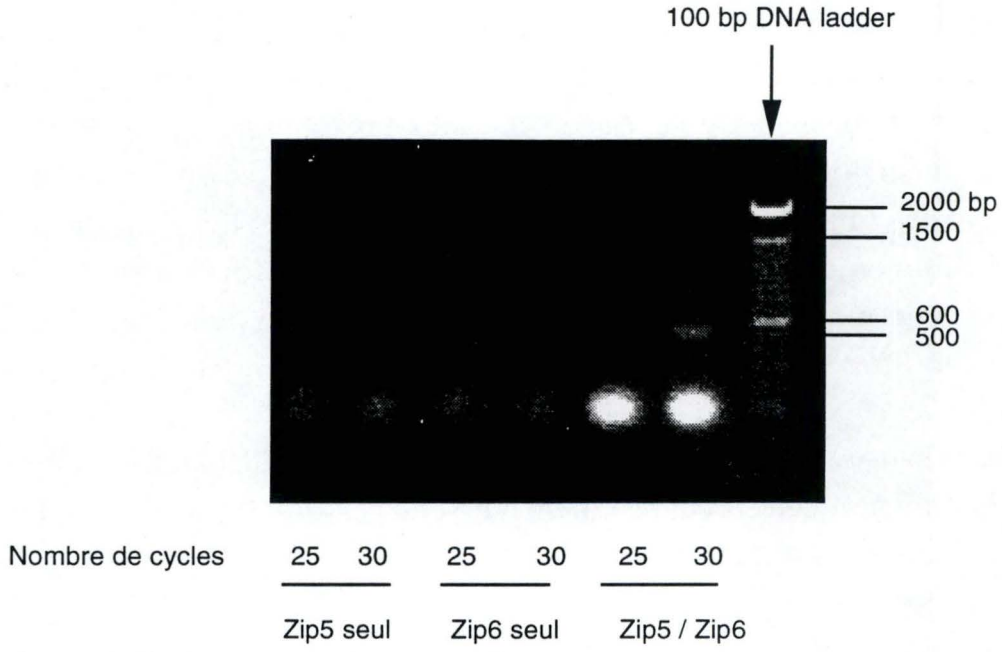


Figure 27: contrôles des amplifications avec Zip5 et Zip6.

Un échantillon de 10 µl de chacun des mélanges des trois amplifications a été prélevé après 25 et 30 cycles et déposé sur gel d'agarose 1% (figure 27). Aucun fragment n'a été amplifié ni avec Zip5 seul ni avec Zip6 seul. Par contre, en bonne concordance avec les tailles prédites par les séquences de TGA1a et de VBP1, nous avons amplifié entre Zip5 et Zip6 un fragment d'une taille comprise entre 500 et 600 pb que nous avons nommé F5-6 .
Depuis le premier ATG jusqu'au codon-stop, TGA1a et VBP1 ont des tailles respectives de 1077 pb et 1349 pb. Le fragment F5-6 chez la chicorée correspondrait donc à une partie importante (respectivement 50% et 37%) d'un gène homologue à TGA1a et VBP1. Nous avons choisi de cloner ce fragment afin de le séquencer. Puisque ce fragment devait correspondre à la partie b-Zip de la protéine, son séquençage nous permettrait d'avoir assez rapidement la confirmation de sa parenté avec les deux protéines CREB-like végétales.

E) Clonage du fragment F5-6 dans pSPORT1.

Le clonage que nous avons réalisé a consisté dans la double restriction *Eco* RI/*Hin*d III du fragment F5-6 et du plasmide pSPORT. La matrice et le fragment d'intérêt ont ensuite été ligués. 2 µl du mélange de ligation ont servi à transformer des bactéries XL1-Blue afin de réaliser un test blanc-bleu (voir matériel et méthodes). Nous avons obtenu 14 colonies blanches correspondant à des bactéries recombinantes (pour environ 400 colonies bleues).

1.- Restriction, ligation et transformation (figure 28).

Afin de disposer d'une quantité suffisante de F5-6 , nous avons procédé à une nouvelle amplification avec Zip5 et Zip6. La totalité du mélange PCR (50 µl) a été déposée sur gel d'agarose 1% et une bande unique d'environ 500 pb a été récupérée à partir du gel. La quantité totale de fragment récupéré a été estimée à environ 75 ng (2 ng/µl) en déposant 5 µl du mélange sur gel et en comparant l'intensité de la bande obtenue avec l'intensité des bandes de l'étalon de poids moléculaire. Nous avons engagé un tiers du mélange (25 ng) pour un clonage dans pSPORT. Classiquement, le rapport molaire matrice/insert est de 1/2,5.
Un échantillon contenant 25 ng de F5-6 et 80 ng de plasmide a été doublement restreint par *Eco* RI et *Hin*d III pendant 1 heure à 37°C. Ils ont ensuite été ligués une nuit à 22°C par la T4 DNA ligase (2 unités). Un échantillon de 100 µl d'*E. coli* XL1-Blue compétentes a été électroporé avec 2 µl du mélange de ligation. Après étalement des bactéries sur milieu de sélection (LBA + ampicilline + Xgal + IPTG), 14 colonies blanches (recombinantes) ont été obtenues.

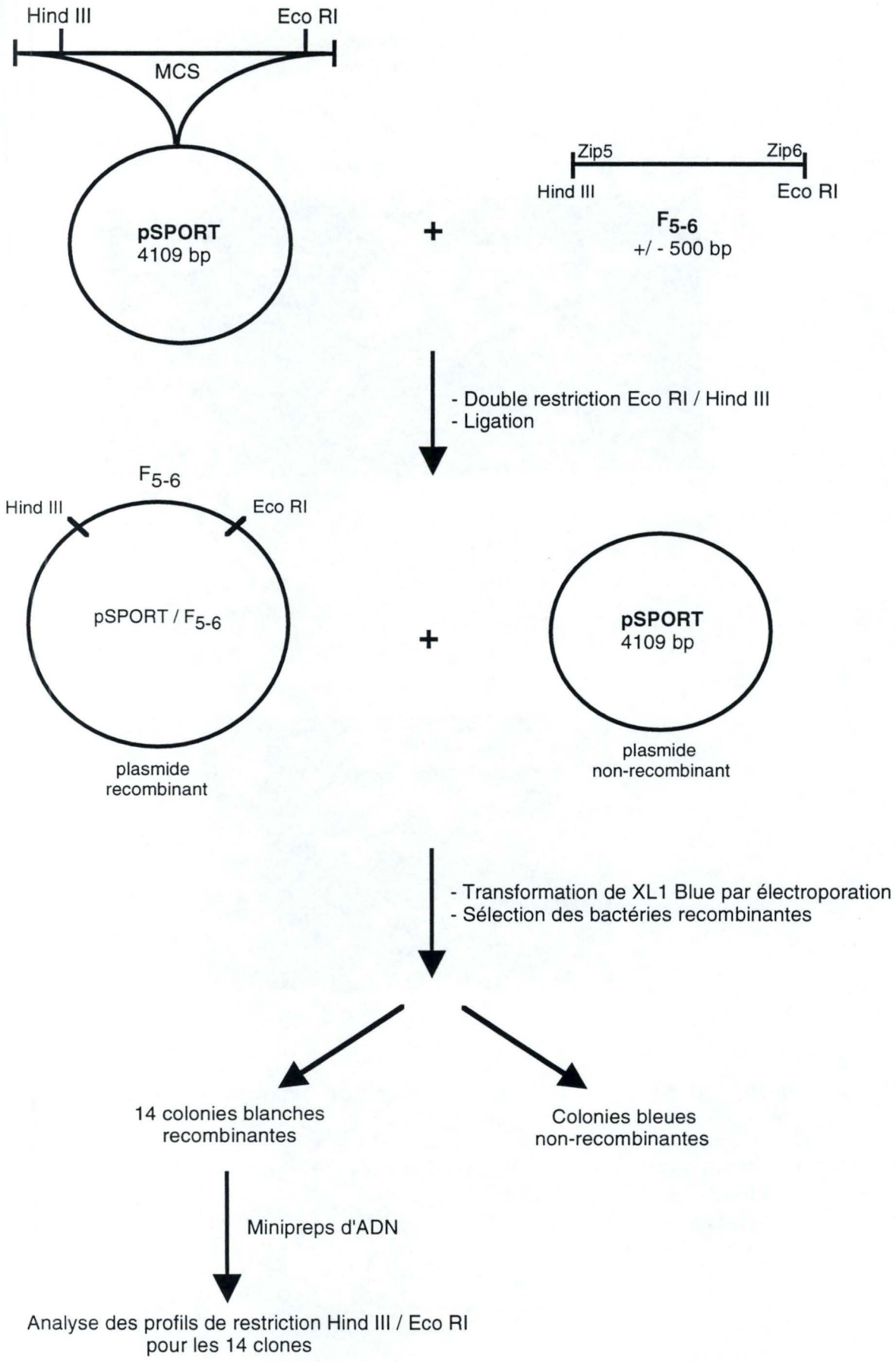


Figure 28: Schéma général du clonage de F_{5-6} dans pSPORT.

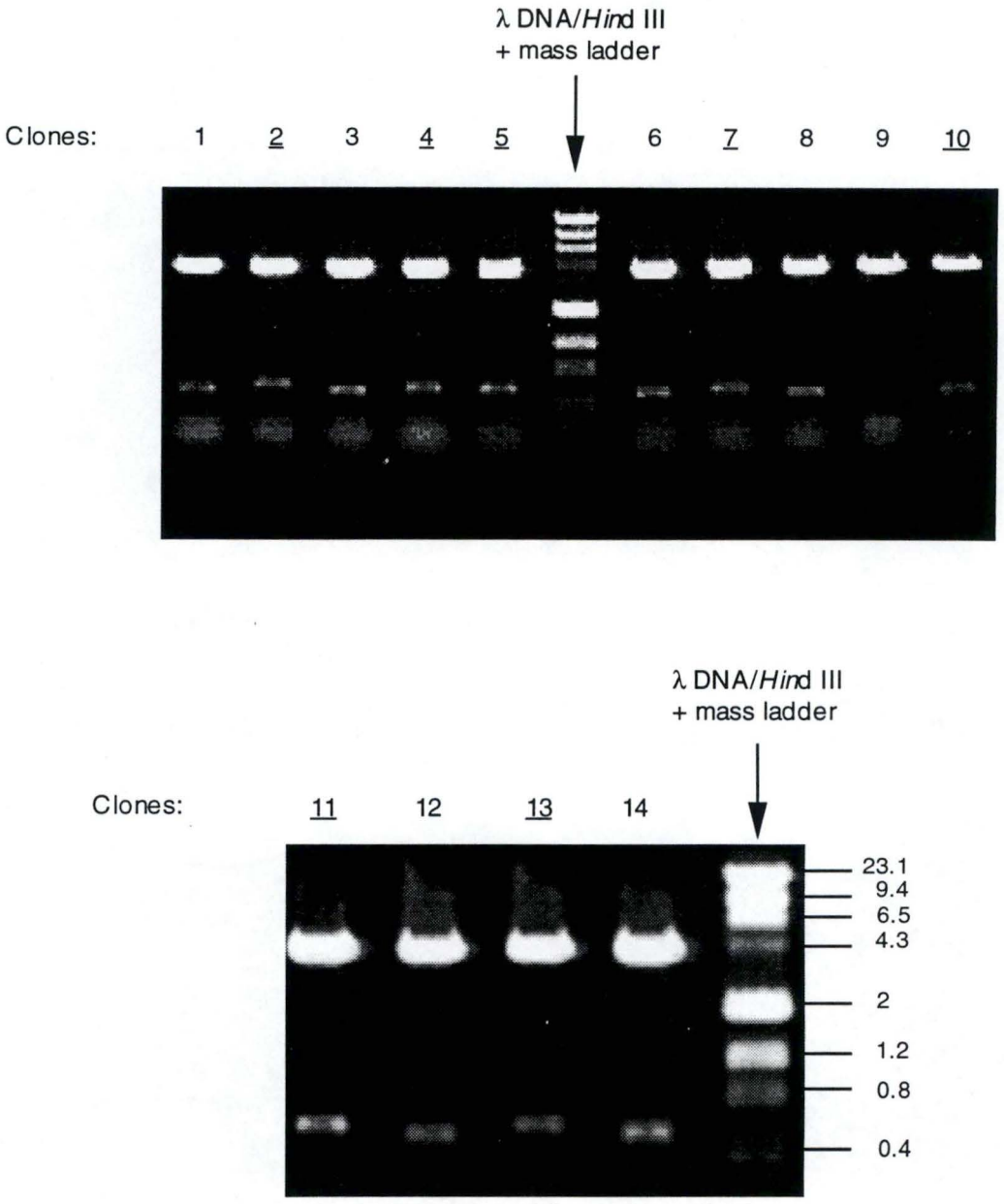


Figure 29: électrophorèse des clones plasmidiques recombinants doublement restreints par *Eco* RI / *Hin*d III.

Les inserts sont répartis en deux populations de tailles légèrement différentes.
Grande taille: clones 2, 4, 5, 7, 10, 11 et 13.
Petite taille: clones 1, 3, 6, 8, 12 et 14.

2.- *Analyse des recombinants.*

Des minicultures liquides ont été réalisées à partir des 14 clones recombinants obtenus et ont donné lieu à 14 mini-préparations d'ADN. Les culots d'ADN plasmidique ont chacun été resuspendus dans 30 µl de TE contenant 10 µg de RNase. Un cinquième de chacun de ces mélanges a été doublement restreint par *Eco* RI et *Hin*d III afin de contrôler la présence d'un fragment d'environ 500 pb dans chacun des 14 clones.

Un dosage de l'ADN pour les différents clones a été effectué au fluorimètre et est présenté ci-dessous:

	cl 1	cl 2	cl 3	cl 4	cl 5	cl 6	cl 7	cl 8	cl 9	cl 10	cl 11	cl 12	cl 13	cl 14
cc en ng/µl	129	112	109	118	88	83	66	88	94	99	103	62	60	72

Un échantillon de 180 ng de chacun des 14 mélanges de restriction a été déposé sur gel d'agarose 1% (figure 29).

Nous pouvons voir que sur les 14 clones recombinants, 13 d'entre eux possèdent bien un fragment de 500 pb. Seul le clone 9 ne présente aucune bande à 500 pb (il s'agit vraisemblablement d'un révertant). Les treize fragments F5-6 ainsi clonés semblent se répartir dans deux groupes de tailles légèrement différentes: les clones 2, 4, 5, 7, 10, 11 et 13 possédent une taille supérieure aux clones 1, 3, 6, 8, 12 et 14. Cette différence de taille sera discutée plus loin.

Nous avons choisi de séquencer les fragments obtenus au clone 2 et au clone 3. En effet ces deux clones illustrent les deux populations de tailles observées. De plus ils possèdent une concentration élevée, ce qui fait d'eux de bons candidats pour une réaction de séquençage.

F) Séquençage et analyse des séquences obtenues.

La méthode de séquençage pratiquée au laboratoire utilise le CircumVent™ Phototope™ Kit de BioLabs. Ce kit se sert de primers biotinylés à leur extrémité 5'. Après migration des échantillons, l'ADN est transféré sur une membrane de Nylon et la révélation s'effectue en trois temps: 1°) la membrane est imprégnée d'une solution de streptavidine qui lie les molécules de biotine présentes sur l'ADN; 2°) des complexes biotine/phosphatase alkaline vont ensuite se fixer au niveau des sites laissés libres sur les molécules de streptavidine; 3°) la membrane

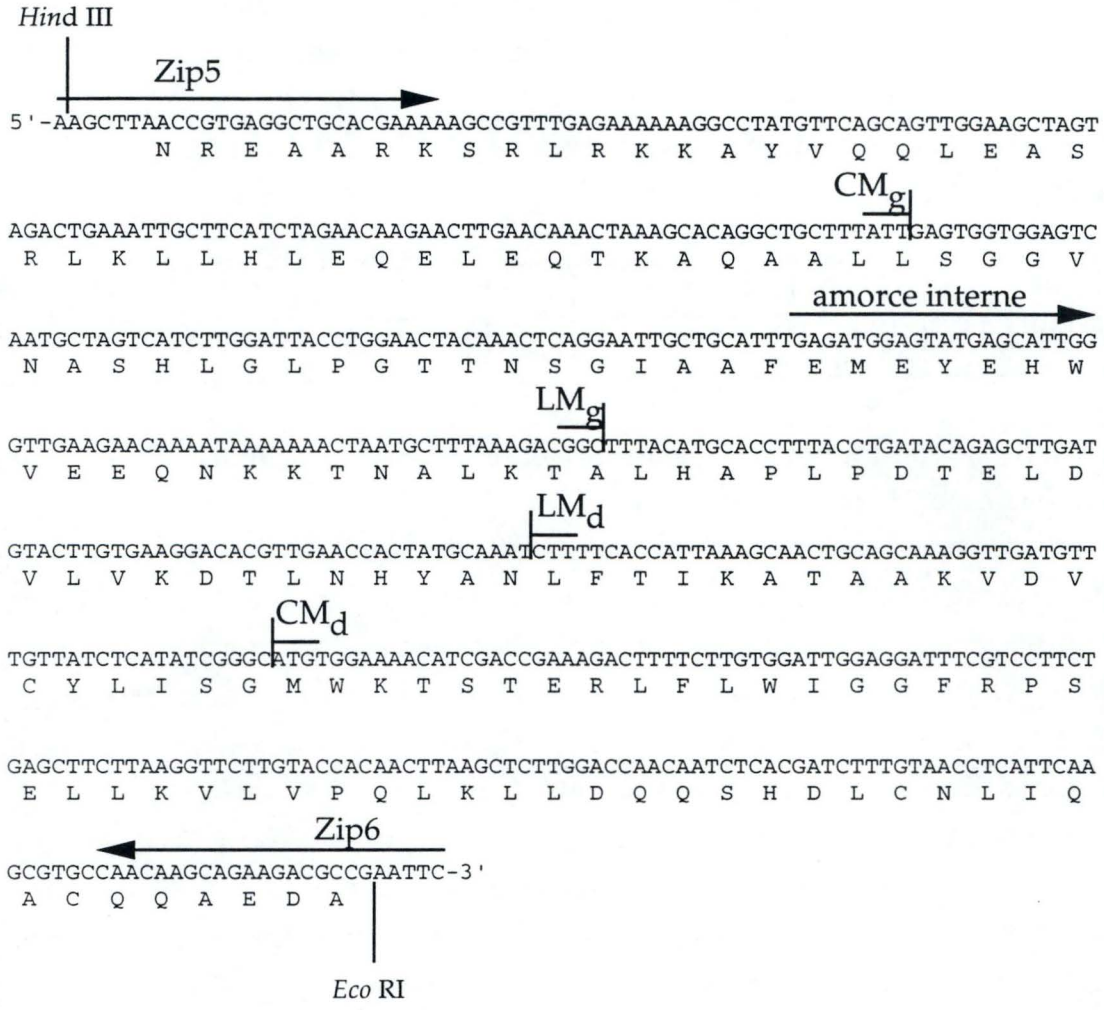


Figure 30: Séquence de F5-6.

CMg et LMg donnent les limites de ce qui a été séquencé avec l'amorce universelle gauche (courtes et longues migrations respectivement); CMd et LMd limitent la portion lue avec l' amorce droite. La lecture complète du fragment a été réalisée grâce à l'amorce interne.

La position des amorces PCR Zip5 et Zip6 ainsi que des sites de restriction ayant servi au clonage sont indiquées.

est finalement rincée dans une solution de Lumigen qui, lorsqu'il est clivé par la phosphatase, émet de la lumière que l'on détecte par autoradiographie.
Deux colorants sont utilisés lors de la réaction de séquençage: le Bleu de Bromophénol qui migre avec les fragments de 26 pb et le Xylène Cyanol qui migre avec les fragments de 106 pb dans un gel de 6% de polyacrylamide.
La réaction de séquençage nécessite 0.02 pmoles d'ADN-cible. Par exemple, dans le cas du clone 2, 60 ng de plasmide recombinant (4100 pb pour pSPORT et 500 pb pour l'insert) correspondent à 0.02 pmoles.

1.- Séquençage du clone plasmidique n°2.

Deux primers universels situés en amont et en aval du site multiple de clonage de pSPORT ont été utilisés pour une première série de réactions de séquençage. Le primer gauche qui reconnaît une séquence plasmidique située 103 bases en amont du site *Hind* III a permis de lire l'extrémité 5' du fragment F5-6. Le primer droit quant à lui s'hybride 107 bases en aval du site *Eco* RI et a permis de lire l'extrémité 3' de F5-6. Les 8 mélanges de séquençage (quatre tubes A, C, G et T pour chacun des deux primers) ont été soumis à deux électrophorèses de durées différentes.
La première migration a duré 2 h 20 min et a été stoppée juste au moment où le deuxième bleu, le Xylène Cyanol, sortait du gel. Cette migration courte nous a permis de retrouver les séquences bordantes du fragment F5-6, à savoir Zip5 et Zip6. Nous avons pu lire à partir de Zip5 et de Zip6 respectivement 128 pb et 156 pb vers l'intérieur du fragment F5-6 (figure 30).
Une seconde migration plus longue (4 h 40 min) a encore permis de lire 129 pb du côté de Zip5 et 57 pb du côté de Zip6, ce qui donne un nombre total de bases lues de 470 (figure 30).
Pour lire la zone la plus interne de notre fragment, nous avons dû synthétiser une nouvelle amorce biotinylée sur base de la séquence déjà lue. Cette amorce située 65 résidus en aval de Zip5 a rendu possible la lecture de 70 bases supplémentaires avant de retomber sur la zone séquencée précédemment (figure 30).
Le fragment F5-6 que nous avons cloné a donc une taille de 540 pb.
Les tailles très proches de F5-6 et du fragment correspondant chez TGA1a (540 et 543 pb respectivement) nous ont conduit à tenter de les aligner manuellement, en faisant intervenir un seul gap correspondant à un acide aminé supplémentaire présent chez TGA1a (thréonine en position 224). Nous avons

A)

```
F5-6:      1 AACCGTGAGGCTGCACGAAAAAGCCGTTTGAGAAAAAAGGCCTATGTTCAGCAGTTGGAA 60
             ||||| |||||||| || |||||||||||| | || |||||||||||||||||||| |||
TGA1a:   284 AACCGCGAGGCTGCTCGTAAAAGCCGTTTGCGGAAGAAGGCCTATGTTCAGCAGTTAGAA 343

F5-6:     61 GCTAGTAGACTGAAATTGCTTCATCTAGAACAAGAACTTGAACAAACTAAAGCACAGGCT 120
               ||||| | ||||  || |||| || |||||||||| ||||   | | |  |||||
TGA1a:   344 AATAGTAAATTGAAGCTGATTCAACTGGAACAAGAACTAGAACGCGCCAGAAAACAGGGC 403

F5-6:    121 GCTTTATTGAGTGGTGGAGTCAATGCTAGTCATCTTGGATTACCTGGAACTACAAACTCA 180
               |   | ||||||| ||  ||||||| || ||  | |   |||||||  | | ||||
TGA1a:   404 ATGTGTGTAGGTGGTGGTGTAGATGCTAGCCAGCTAAGTTACTCTGGAACCGCTAGCTCA 463

F5-6:    181 GGAATTGCTGCATTTGAGATGGAGTATGAGCATTGGGTTGAAGAACAAAATAAAAAAACT 240
             |||| ||||| |||||| |||||||||  || ||||| ||||| |||| || | ||||
TGA1a:   464 GGAACTGCTGTATTTGATATGGAGTATGGTCACTGGGTAGAAGAGCAAACTAGACAAACA 523

F5-6:    241 AATGCTTTAAAGACGGCTTTACATGCACCTTTACCTGATACAGAGCTTGATGTACTTGTG 300
             ||||  |||| ||  ||||| ||| | |   |  |||  | ||  |     |  ||||
TGA1a:   524 AATGACTTAAGGATTGCTTTGCATTCTCAAATTGGTGAAGCGGAATTGCGCATTATTGTT 583

F5-6:    301 AAGGACACGTTGAACCACTATGCAAATCTTTTCACCATTAAAGCAACTGCAGCAAAGGTT 360
               | |      ||||||||||     |||| |||  ||| |||||  || || || || | |
TGA1a:   584 GATGGTTACCTGAACCACTACTTTGATCTCTTCCGCATGAAAGCTACGGCTGCTAAAGCT 643

F5-6:    361 GATGTTTGTTATCTCATATCGGGCATGTGGAAAACATCGACCGAAAGACTTTTCTTGTGG 420
             |||||    ||  |||| || || |||||||| |||||  ||||  |  ||||| |||||
TGA1a:   644 GATGTCCTATACATCATGTCTGGTATGTGGAAGACATCTGCCGAGCGCTTTTTCATGTGG 703

F5-6:    421 ATTGGAGGATTTCGTCCTTCTGAGCTTCTTAAGGTTCTTGTACCACAACTTAAGCTCTTG 480
             |||||||| ||||| || || |||||||| ||||||||   ||| || ||| ||||||||
TGA1a:   704 ATTGGAGGGTTTCGGCCATCCGAGCTTCTAAAGGTTCTCACACCGCATCTTGAGCTCTTG 763

F5-6:    481 ---GACCAACAATCTCACGATCTTTGTAACCTCATTCAAGCGTGCCAACAAGCAGAAGACGCC 540
                 || ||||||  ||  ||  |||||||||| |  |||   || || ||||||||||||||
TGA1a:   764 ACAGAACAACAACTTCGAGAGGTTTGTAACCTGACCCAATCATGTCAGCAAGCAGAAGACGCC 826
```

B)

```
F5-6:      1 NREAARKSRLRKKAYVQQLEASRLKLLHLEQELEQTKAQAALLSGGVNASHLGLPGTTNS 60
             NREAARKSRLRKKAYVQQLE S+LKL+ LEQELE+ + Q   + GGV+AS L   GT +S
TGA1a:    82 NREAARKSRLRKKAYVQQLENSKLKLIQLEQELERARKQGMCVGGGVDASQLSYSGTASS 141

F5-6:     61 GIAAFEMEYEHWVEEQNKKTNALKTALHAPLPDTELDVLVKDTLNHYANLFTIKATAAKV 120
             G A F+MEY HWVEEQ ++TN L+ ALH+ + + EL ++V   LNHY +LF +KATAAK
TGA1a:   142 GTAVFDMEYGHWVEEQTRQTNDLRIALHSQIGEAELRIIVDGYLNHYFDLFRMKATAAKA 201

F5-6:    121 DVCYLISGMWKTSTERLFLWIGGFRPSELLKVLVPQLKLL-DQQSHDLCNLIQACQQAEDA 180
             DV Y++SGMWKTS ER F+WIGGFRPSELLKVL P L  L +QQ  ++CNL Q+CQQAEDA
TGA1a:   202 DVLYIMSGMWKTSAERFFMWIGGFRPSELLKVLTPHLELLTEQQLREVCNLTQSCQQAEDA  244
```

Figure 31:
(A) alignements entre les séquences nucléotidiques de F5-6 et TGA1a (72 % d'identités)
(B) alignements entre les séquences protéiques de F5-6 et TGA1a (78 % de similtudes dont 64 % d'identités).

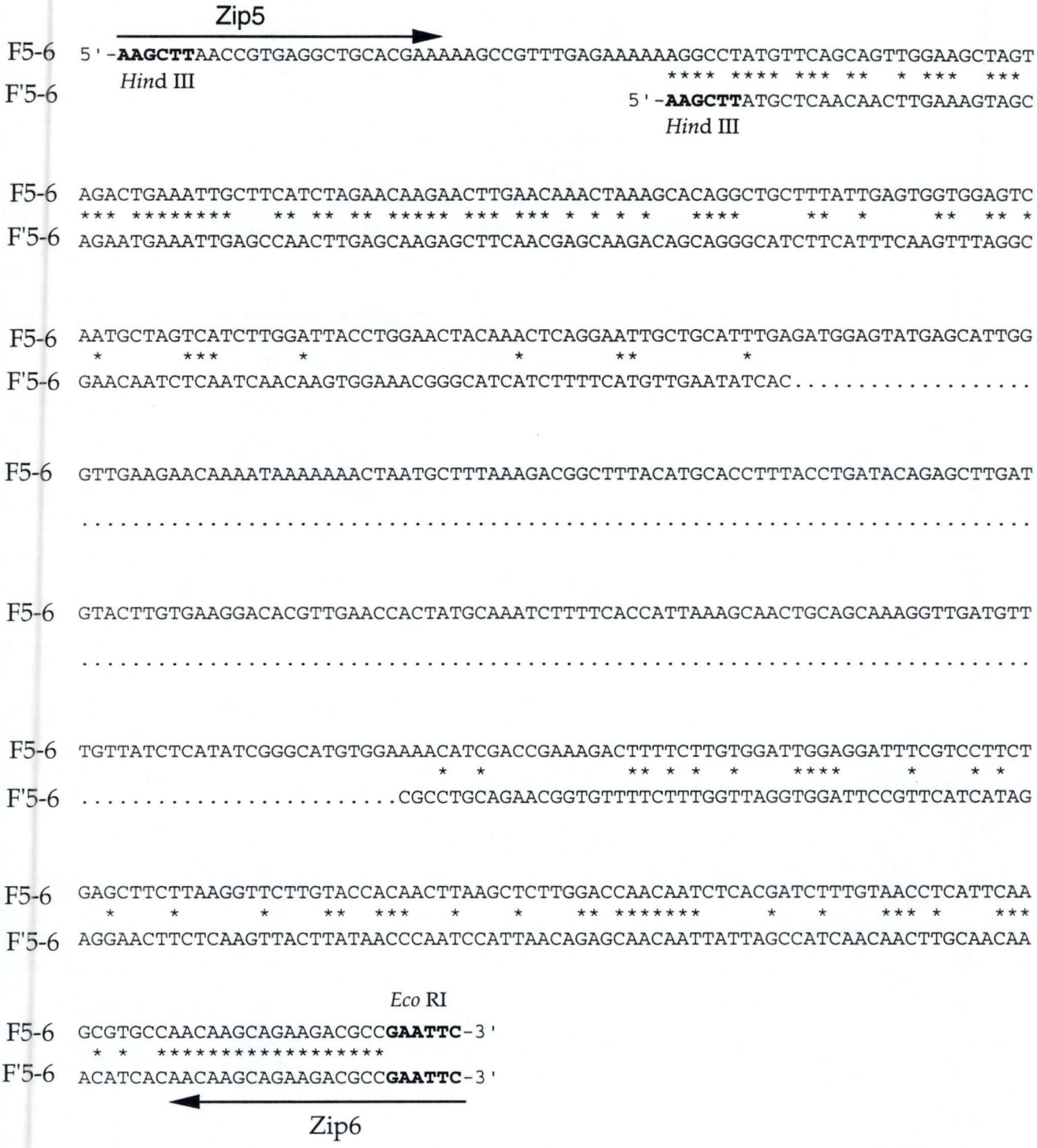


Figure 32: Alignement des séquences nucléotidiques entre F5-6 et F'5-6. Les sites de restriction utilisés lors du clonage de l'insert dans pSPORT sont indiqués. Il existe un site *Hind* III juste avant la partie codant pour la leucine-zipper de F'5-6, alors qu'il est absent chez F5-6.

ainsi pu recenser 78 % de similitudes[13] entre ces deux séquences, dont 64 % de résidus identiques (figure 31 B). Leur domaine basique est identique et les trois leucines du motif leucine-zipper s'alignent parfaitement. Comme en témoigne son motif b-Zip, F5-6 appartiendrait donc à une protéine liant l'ADN (nommée CiBP1 dans la suite).
Remarquons qu'au niveau nucléotidique, les séquences de F5-6 et TGA1a sont aussi très conservées (72 % d'identités) (figure 31 A).

2.- *Séquençage du clone plasmidique n°3.*

Afin d'expliquer les différences de tailles de nos fragments dans les différents clones, nous avons décidé de séquencer le clone 3 qui présente une bande de taille nettement inférieure à celle du clone 2. Lors de l'étude de la séquence du clone 2, nous avons remarqué qu'aucun site de restriction *Eco* RI ou *Hin*d III n'était présent à l'intérieur de F5-6. La ou les bandes de taille inférieure ne peuvent donc pas provenir d'une restriction partielle de F5-6. Il s'agit soit d'artéfacts soit d'ADNc différents mais homologues, amplifiés par les mêmes amorces.
Seuls les primers universels ont été utilisés pour séquencer le clone 3 au cours d'une courte et d'une longue migration. De la sorte, nous avons pu séquencer un total de 330 bases, réparties en deux fragments situés de part et d'autre d'une portion non-séquencée.
Nous avons baptisé F'5-6 ce fragment incomplètement séquencé et CiBP2, la protéine dont il fait partie.
A une extrémité du fragment on retrouve bien la séquence correspondant à Zip6 ainsi que son site de restriction *Eco* RI. A l'autre extrémité, par contre, la séquence de Zip5 n'est pas retrouvée malgré la présence d'un site *Hin*d III (figure 32).

3.- *Comparaison de F5-6 et de F'5-6.*

Le séquençage de l'insert du clone 3 (F'5-6) permet d'expliquer pourquoi celui-ci est plus court que l'insert du clone 2 (F5-6). Il semble à présent que, lors de la PCR utilisant Zip5 et Zip6 comme amorces, deux populations de produits d'amplification de même taille, mais de séquences différentes, étaient mêlées. Les fragments de l'une de ces populations ne contenaient pas de site *Hin*d III et ont pu être clonés dans leur entièreté dans pSPORT (clones 2, 4, 5, 7, 10, 11 et 13). Par contre les fragments de l'autre population possédaient un site *Hin*d III interne. Après une double restriction *Hin*d III/*Eco* RI, nous n'avons donc pas pu

[13]Le pourcentage de similitudes a été calculé en tenant compte des acides aminés semblables d'un point de vue physico-chimique (Rawn, 1990, pp 54-58).



Figure 33: Alignement entre VBP1, F'5-6, F5-6 et TGAa1a. Les signes "*" marquent les identités entre la séquence du dessus et celle du dessous.
Sur la portion où les quatre séquences sont disponobles (105 résidus), on observe que F5-6 et TGA1a présentent 66 % d'identités entre elles contre 46,5 % entre F5-6 et F'5-6. De même, F'5-6 présente 72 % d'identités avec la séquence de VBP1.

cloner l'entièreté du fragment amplifié (clone 1, 3, 6, 8, 12 et 14). Le site *Hind* III présent dans ce fragment se situe une trentaine de pb en amont de la zone où s'hybride Zip5, ce qui explique pourquoi nous n'avons pas pu retrouver la séquence de Zip5 lors du séquençage de F'5-6 (figure 32).
La figure 33 donne l'alignement en acides aminés des parties séquencées de F'5-6 et de F5-6 avec les parties correspondantes de TGA1a et VBP1. F'5-6 possède lui-aussi le motif leucine-zipper. CiBP2 est donc une protéine très proche ou une isoforme de la protéine CiBP1 de la chicorée dont nous connaissons le fragment F5-6.
Sur la portion où les quatre séquences sont disponibles, on observe que F5-6 et F'5-6 ne présentent que 46.5 % d'identités contre 66 % entre F5-6 et TGA1a et 72 % entre F'5-6 et VBP1 (figure 33). La différence entre les deux séquences de la chicorée est donc plus importante que la différence inter-spécifique.
Ceci suggère l'hypothèse suivante: dans chaque espèce de plante existerait une famille composée de plusieurs gènes de protéines b-Zip codant chacun pour une isoforme de facteur de transcription. En cela, les facteurs b-Zip chez les plantes ressembleraient à la famille CREB/ATF des mammifères. Chaque isoforme aurait un rôle bien particulier dans chaque espèce (activateur ou répresseur de la transcription, ubiquiste ou tissu-spécifique), et chaque espèce posséderait la série complète des isoformes. TGA1 pourrait donc être le correspondant "tabac" de CiBP1 chez la chicorée, VBP1 le correspopndant "*Vicia fabae*" de CiBP2.

4.- Recherche dans les banques de données.

Afin de vérifier le fait que TGA1a constitue bien la protéine connue la plus proche de CiBP1, nous avons effectué une recherche des séquences similaires à F5-6[14] dans les banques de séquences protéiques disponibles sur le réseau Internet. L'algorithme BLAST (Basic Local Alignement Search Tool; Altschul *et al.*, 1990) nous a permis de retrouver 24 séquences présentant une similarité significative avec F5-6. La protéine donnant le meilleur score de similarité est TGA1a (figure 34). Les autres protéines mises en évidence lors de notre recherche sont toutes des protéines b-Zip isolées de végétaux comme MBPF3 de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), HBP-1 du blé (*Triticum aestivum*) ou des facteurs de transcription de *Arabidopsis thaliana*. CiBP1 appartient donc bien à la famille des facteurs de transcription b-Zip végétaux, et plus précisement au sous-groupe des protéines b-Zip liant les "C-box"auquel appartiennent TGA1a et VBP1.

---

[14]F'5-6 n'étant pas séquencé complètement, nous n'avons pas effectué de recherche avec ce fragment.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
emb|X16449|NICTGA1A	Tobacco mRNA for TGA1a DNA-binding ...	1158	3.0e-99	2
gb|S73827|S73827	mas-binding factor MBF3=transcripti...	690	4.4e-95	3
gb|S73826|S73826	mas-binding factor MBF2=transcripti...	690	5.1e-95	3
gb|L28005|SOYSTGA	Glycine max TGACG-motif binding pro...	1041	2.3e-85	2
emb|X82544|STD11	S.tuberosum mRNA for leucine zipper...	1077	4.5e-82	1
emb|X68053|ATTGA1	A.thaliana TGA1 mRNA	960	6.7e-80	2
gb|S73828|S73828	mas-binding factor MBF1=transcripti...	708	9.6e-78	2
emb|X69899|ATOBF4A	A.thaliana OBF4 mRNA	969	9.1e-72	1
gb|L10209|ATHTAGIA	Arabidopsis thaliana transcription ...	928	5.2e-68	1
gb|M62855|TOBPG13A	Nicotiana tabacum PG13 (ASF-1/G13) ...	603	1.7e-67	3
gb|M81827|VFACREBL	Vicia faba CREB-like protein mRNA, ...	486	1.7e-57	3
gb|H36941|H36941	15070 Arabidopsis thaliana cDNA clo...	706	3.3e-49	1
gb|L42327|ATHLEZI	Arabidopsis thaliana leucine zipper...	447	1.3e-46	2
dbj|D10042|ATHAHBP1B	A.thaliana mRNA for AHBP-1b, comple...	482	1.1e-44	2
emb|X69900|ATOBF5A	A.thaliana OBF5 mRNA	429	2.7e-44	3
emb|X69152|ZMOCSBFB	Z.mays OBF3.2 mRNA for ocs-element ...	458	2.7e-43	2
gb|T22979|T22979	4987 Arabidopsis thaliana cDNA clon...	536	6.8e-35	1
emb|X56782|TA1B38	T.aestivum 1b-c38 gene for HBP-1b (...	505	6.7e-32	1
gb|R90199|R90199	16554 Arabidopsis thaliana cDNA clo...	489	8.3e-31	1
gb|T43589|T43589	6852 Arabidopsis thaliana cDNA clon...	294	3.6e-21	2
dbj|D12921|WHTHBP1BC1	Wheat mRNA for transcription factor...	293	4.2e-14	1
emb|X69153|ZMOCSBFC	Z.mays OBF3.1 mRNA for ocs-element ...	265	9.1e-12	1
gb|T88203|T88203	11899 Arabidopsis thaliana cDNA clo...	165	0.0020	1
gb|T76386|T76386	11164 Arabidopsis thaliana cDNA clo...	157	0.0083	1
gb|S63828|S63828	SLG2=membrane-anchored protein [Bra...	127	0.97	1
gb|U22825|DMU22825	Drosophila melanogaster amnesiac ne...	126	0.99	1
emb|Z15124|DDCDYNHC	D.discoideum mRNA for cytoplasmic d...	122	0.99993	1

Figure 34: Liste des protéines de séquences significativement similaires à F5-6 trouvées par BLAST dans une banque de 600 930 séquences non-redondantes.

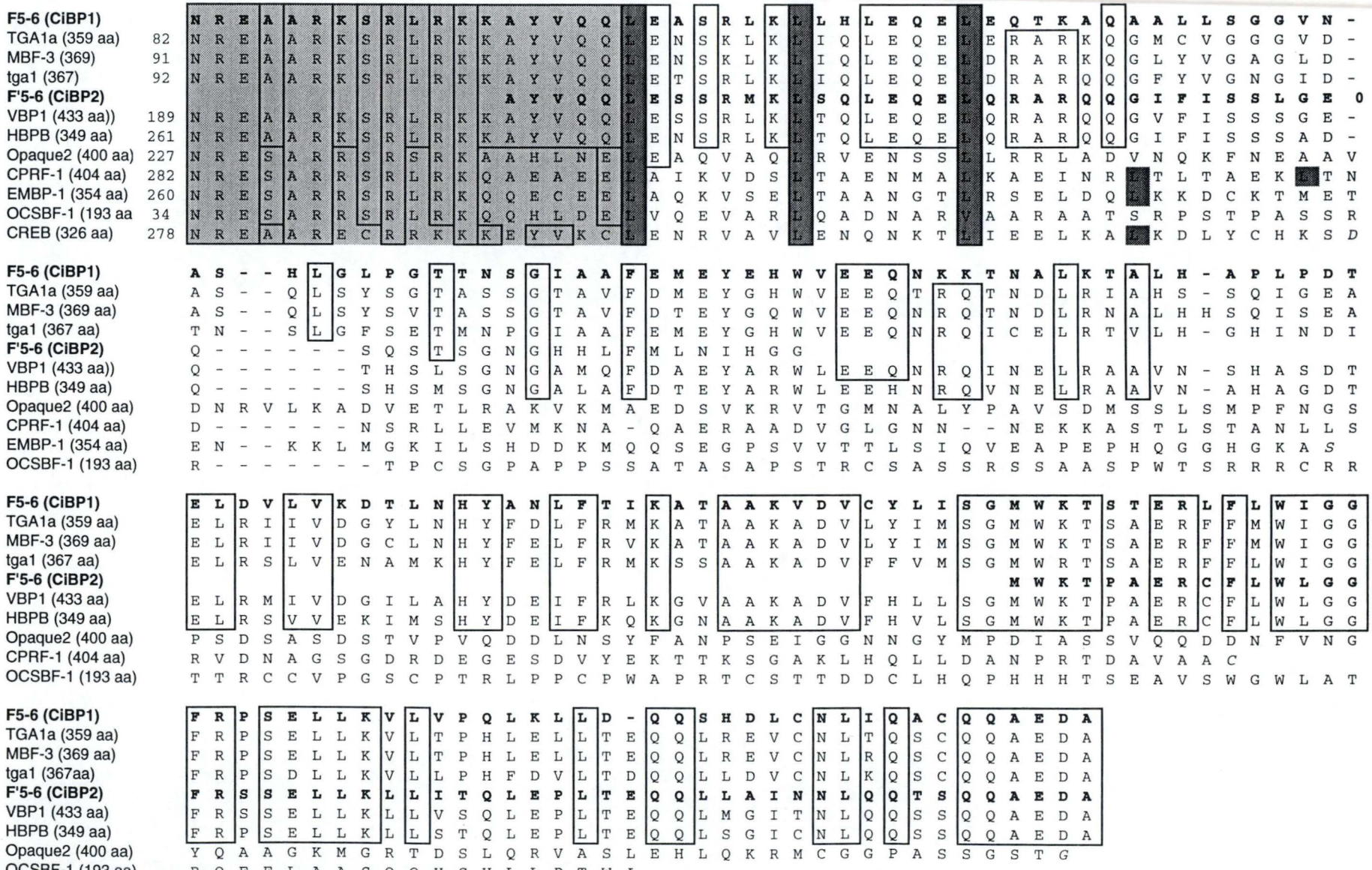


Figure 35: Alignement multiple des régions correspondant au fragment F5-6 des CiBP, de plusieurs b-Zip végétales et de CREB. Les régions conservées sont encadrées, le domaine b-Zip est en grisé. L'aa C-terminal est en italique.

5.- Alignements multiples entre F5-6, d'autres b-Zip protéines végétales et CREB.

Un alignement multiple de plusieurs b-Zip végétales, de la CREB humaine et des fragments F5-6 et F'5-6 a été réalisé. Seules les portions comprises entre le domaine basique et l'extrémité carboxy-terminale de chacune de ces séquences ont été inclues dans l'alignement afin de correspondre avec les protéines CiBP1 et CiBP2 dont nous ne connaissons qu'un fragment.

Au départ, l'alignement a été réalisé grâce au programe Clustal, sans modifier les paramètres de pénalités des gaps donnés par défaut (Thompson, 1994). Ensuite, l'introduction à la main d'un gap unique d'un seul acide aminé dans 6 séquences a permis d'aligner les 3 leucines du motif leucine-zipper pour toutes les séquences (voir figure 35).

L'examen de l'alignement permet d'observer que:

1°) F5-6 et F'5-6 appartiennent à un groupe homogène de protéines végétales de séquences relativement proches qui comprend TGA1a, MBF-3, TGA 1, VBP1 et HBPB. Les autres protéines végétale (CPRF-1, opaque2, EMBP-1, OCSBF-1) présentent des séquences relativement divergentes de celles du groupe de TGA1a, tout en étant peu homogènes entre elles. La région qui montre le plus d'identités entre toutes ces séquences est le domaine basique, qui correspond au domaine de liaison à l'ADN. Le domaine basique des protéines du groupe de TGA1a est identique pour toutes les séquences.

Ce classement des séquences végétales en deux groupes qui se dégage de l'alignement multiple correspond au classement fonctionnel des b-Zip végétales établi suivant leur spécificité de liaison pour les "G-box" (CPRF-1, opaque2, EMBP-1, OCSBF-1) et les "C-box" (TGA1a, MBF-3, TGA 1, VBP1 et HBPB).

L'appartenance de F5-6 et de F'5-6 au groupe des protéines b-Zip liant les "C-box" indique que ces deux protéines se lieraient à l'ADN sur une séquence de type 5'-AGCTC-3', c'est-à-dire une séquence très proche de la séquence du CRE.

2°) Les protéines b-Zip végétales du groupe de TGA1a ne possèdent que 3 leucines dans leur motif leucine-zipper, alors que CREB en possède 4. Remarquons que deux b-Zip végétales de type G-box possèdent une quatrième leucine.

Après cette quatrième leucine, la séquence de CREB se prolonge encore de 9 acides aminés seulement, contre 245 pour TGA1a. Ceci correspond au fait que le domaine b-Zip de CREB se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine, tandis que chez les facteurs de transcription végétaux, il se situe en moyenne au début du deuxième tiers de la séquence.

3°) Si on compare le domaine basique de F5-6 repris ci-dessous avec toutes les séquences alignées, on observe que:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
N	R	E	A	A	R	K	S	R	L	R	K	K	A	Y	V	Q	Q

- aux positions 1, 2, 3, 5, 6, 9 et 12 les acides aminés sont conservés entre toutes les séquences, CREB y compris;
- aux positions 8 et 11 les acides aminés sont conservés entre les protéines végétales uniquement;
- aux positions 7, 10, 14, 17 et 18 les résidus sont conservés entre les protéines liant les"C-box";
- aux positions 4, 13, 15 et 16 les résidus sont conservés entre CREB et le groupe des protéines liant les "C-box".

De ce qui précède, nous pouvons conclure que le domaine de fixation à l'ADN de CREB est apparemment plus proche du domaine basique des protéines du groupe "C-box" (dont CiBP1 et CiBP2 font partie) que de celui des autres b-Zip végétales. Ceci pourrait indiquer que CiBP1 et CiBP2 sont capables de se lier à une séquence de type CRE.

Chapitre 4 . Conclusions générales et perspectives.

Au terme de ce travail, nous avons pu mettre en évidence chez la chicorée l'existence de deux protéines b-Zip (CiBP1 et CiBP2), homologues entre elles.
D'après ce que nous connaissons des séquences de CiBP1 et CiBP2, il semble que ces deux protéines soient moins proches l'une de l'autre que de leurs équivalents respectifs dans d'autres espèces (TGA1a du tabac pour CiBP1 et VBP1 de *Vicia faba* pour CiBP2).
Etant donné l'homologie qui existe entre CiBP1/CiBP2 et d'autres b-Zip végétales liant une séquence de type C-box (5'-ACGTC-3'), il est probable qu'elles aient une spécificité semblable de liaison à l'ADN.

En quoi ce clonage nous permet-il d'apporter des réponses quant à l'existence d'une voie de transduction du signal dépendante de l'AMPc chez la chicorée ? Ou encore, quels sont les arguments qui appuient l'hypothèse selon laquelle CiBP1 et CiBP2 seraient de bons candidats CREB ?

1°) CiBP1 et CiBP2 possèdent un domaine b-Zip, ce qui permet de les considérer comme des facteurs de transcription;
2°) le domaine basique de liaison à l'ADN de CiBP1 est très conservé chez CREB;
3°) les fragments de CiBP1 et CiBP2 que nous avons séquencés ressemblent fortement à TGA1a et VBP1, respectivement, dont on a montré qu'elles possédaient une spécificité de liaison à l'ADN identique à celle de CREB (Katagiri *et al.*, 1989; Ehrlich *et al.*, 1992);
4°) les séquences de F5-6 et F'5-6 indiquent la présence chez la chicorée d'au moins deux isoformes de b-Zip protéines. Il pourrait donc exister chez cette espèce une famille multigénique de b-Zip protéines comparable à la famille CREB/ATF.

Bien que ces arguments soient clairement en faveur de l'existence chez les cellules végétales de protéines de type CREB, nous ne pouvons rien affirmer quant à la fonction de CiBP1 et CiBP2 chez la chicorée sur la seule base d'homologies de séquences. En effet, dans les cellules animales, il existe des b-Zip homologues à CREB et appartenant à la famille AP-1 qui reconnaissent un motif très proche du CRE mais qui ne sont cependant pas dépendantes de l'AMPc. Il est

donc indispensable de vérifier si la fonction des protéines contenant F5-6 et F'5-6 dépend de l'AMPc et de valider ainsi l'hypothèse selon laquelle l'AMPc est un messager secondaire chez les cellules végétales.
L'identification de protéines b-Zip chez la chicorée constituait la première étape nécessaire de l'étude de la régulation de la transcription par l'AMPc chez cette espèce.
A l'issue de cette première étape, les perspectives sont nombreuses et variées.

Dans un premier temps, il s'agira de séquencer l'entièreté des ADNc codant pour CiBP1 et CiBP2. Ceci pourrait être réalisé facilement en faisant synthétiser des amorces correspondant à Zip5 et à Zip6 dépourvues de site de restriction et en effectuant des réactions de 5'-RACE et de 3'-RACE. Les produits 5'- et 3'-RACE ainsi obtenus peuvent ensuite être fusionnés grâce à la présence d'une région interne de recouvrement correspondant au fragment F5-6. Le clonage dans un plasmide devrait ensuite permettre de séquencer les zones bordantes du fragment F5-6 et d'arriver à lire la séquence depuis le début de l'ARNm correspondant jusqu'à sa queue de poly-A. Des comparaisons de séquences dans les banques de données permettraient alors de déterminer les similarités existant entre CiBP1 et CiBP2 ainsi qu'avec d'autres protéines b-Zip végétales et animales. A ce stade il serait intéressant de repérer s'il existe chez CiBP1 et CiBP2 des motifs de reconnaissance par les kinases ressemblant à ce qui existe dans la P-box chez CREB, ainsi que des motifs riches en glutamines.

Dans un second temps, des études fonctionnelles devraient être réalisées pour tenter de caractériser les fonctions de CiBP1 et de CiBP2. Il sera donc nécessaire de cloner leurs ADNc correspondants dans un vecteur d'expression. Après induction de leur expression et purification, plusieurs tests sont possibles:
1°) étudier la phosphorylation *in vitro* et *in vivo* de ces protéines par la sous-unité catalytique de la PKA en présence de (γ-^{32}P) ATP (Gonzalez *et al.*, 1989);
2°) effectuer des gels-retard à l'aide de sondes oligonucléotidiques contenant le motif CRE. Ces sondes pourront être modifiées de deux manières afin d'étudier la spécificité de liaison: mutations au niveau du palindrome et méthylation des cytosines (Ehrlich *et al.*, 1992).
3°) étudier la dimérisation de CiBP1 et de CiBP2;
4°) mettre en évidence la fonction de transactivation des CiBP en construisant un gène de fusion entre une séquence promotrice contenant des CRE et un gène rapporteur tel CAT (chloramphénicol acétyltransférase; Montminy *et al.*, 1986)
5°) identifier les gènes végétaux dont ils régulent la transcription.

6°) rechercher les facteurs protéiques avec lesquels ils interagissent physiquement ou indirectement, en correspondance avec ce qu'on connaît de l'interaction de CREB avec la machinerie transcriptionnelle.

Les approches suivies depuis de nombreuses années dans l'étude de voies de transduction AMPc-dépendante chez les animaux pourraient être appliquées à des recherches de ce type chez les végétaux.

Il serait ainsi possible de confirmer le rôle de messager secondaire de l'AMPc chez les plantes et de construire peu à peu un schéma cohérent de régulation de la transcription AMPc-dépendante chez les cellules végétales.

Chapitre 5 . Matériel et Méthodes.

I) Matériel.

A) Tampons et solutions.

1.- Pour l'ADN.

- **TE**

10 mM Tris-base (Pharmacia Biotech); 1 mM EDTA (Sigma); pH 8.0.

- **TAE**

Préparer une solution stock 50 X cc.

Pour 1 l: 242 g Tris-base; 57.1 ml acide acétique glacial; 100 ml EDTA 0.5 M; pH 8.0.

- **TBE**

Préparer une solution stock 5 X cc.

Pour 1 l: 54 g Tris-base; 27.5 g acide borique (Pharmacia Biotech); 20 ml EDTA 0.5 M; pH 8.0.

- **Tampon A**

2 % p/v sucrose; 0.1 % v/v Triton X-100 (Janssen); 50 mM EDTA; 50 mM Tris-base, pH 8.0.

- **TNE 10 X cc**

solution stock 10 X cc: 100 mM Tris-HCl (pH 7.4); 10 mM EDTA; 2 M NaCl.

Filtrer la solution sur Millipore 0.22 µm.

- **HOECHST**

solution stock: 10 mg/ml.

A conserver à - 20°C à l'abri de la lumière.

- **TNE + HOECHST**

échelle de 10 à 500 ng d'ADN: 1 µl sol. stock HOECHST dans 100 ml TNE 1 X cc.

échelle de 100 à 2000 ng d'ADN: 10 µl sol. stock HOECHST dans 100 ml TNE 1 X cc.

- **Blocking Solution**

3 mM Na_2HPO_4; 8 mM NaH_2PO_4; 127 mM NaCl; 173 mM SDS; pH 7.2.

Pour 1 l de solution: 7.3 g NaCl; 2.41 g Na_2HPO_4; 0.96 g NaH_2PO_4; 49.89 g SDS.

Note: filtrer le volume nécessaire sur Millipore 0.22 µm avant chaque utilisation.

- **Wash Solution I**

diluer 10 X la Blocking Solution.

- **10 X Wash Solution II**

4 mM Tris-base; 100 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; pH 9.5.

Stocker cette solution à 4°C. Préparer une solution 1 X cc juste avant emploi.

- **Tampons de séquençage**

fournis avec le CircumVent^{TM} -Phototope^{TM} Kit de BioLabs.

2.- *Pour l'ARN.*

- H_2O RNase-free.

Préparer de l'eau contenant de 0.01% à 0.1% DEPC (Diéthyl pyrocarbonate, SIGMA) afin de la rendre libre de toute RNase.

Secouer fortement la bouteille et incuber 2 h à 37°C. Autoclaver.

L'eau RNases-free servira à préparer toutes les solutions intervenant dans la préparation des ARN.

- BB

10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 1 mM EDTA; 0.3 M NaCl; 0.1 % p/v SDS (BioChemika).

Note: conserver à température ambiante afin d'éviter la précipitation du SDS au contact du froid, précipitation favorisée par la salinité élevée.

- EB

10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 1 mM EDTA; 0.1 % p/v SDS.

A conserver à température ambiante.

B) Milieux utilisés.

- SOC

2 % bactotryptone (DIFCO); 0.5 % extraits de levure (DIFCO); NaCl 10 mM; KCl 2.5 mM; $MgCl_2$ 10 mM; $MgSO_4$ 10mM; glucose 20 mM.

Note: il ne faut pas autoclaver le glucose. Filtrer la solution de glucose sur Millipore 0.22 µm et la rajouter ensuite dans le milieu ci-dessus préalablement autoclavé.

- LB

20 g/l LB BrothBase.

Stériliser par autoclavage (20 min à 120°C).

- LBA

37 g/l Luria Agar (Millers LB Agar; GIBCO BRL).

Stériliser par autoclavage et couler dans les boîtes de Pétri avant solidification (25 ml de LBA/boîte).

Note: entourer les boîtes LBA d'un parafilm et les conserver à 4°C. Sortir les boîtes du frigo juste avant emploi et les ouvrir 30 min dans le flux pour les faire sécher.

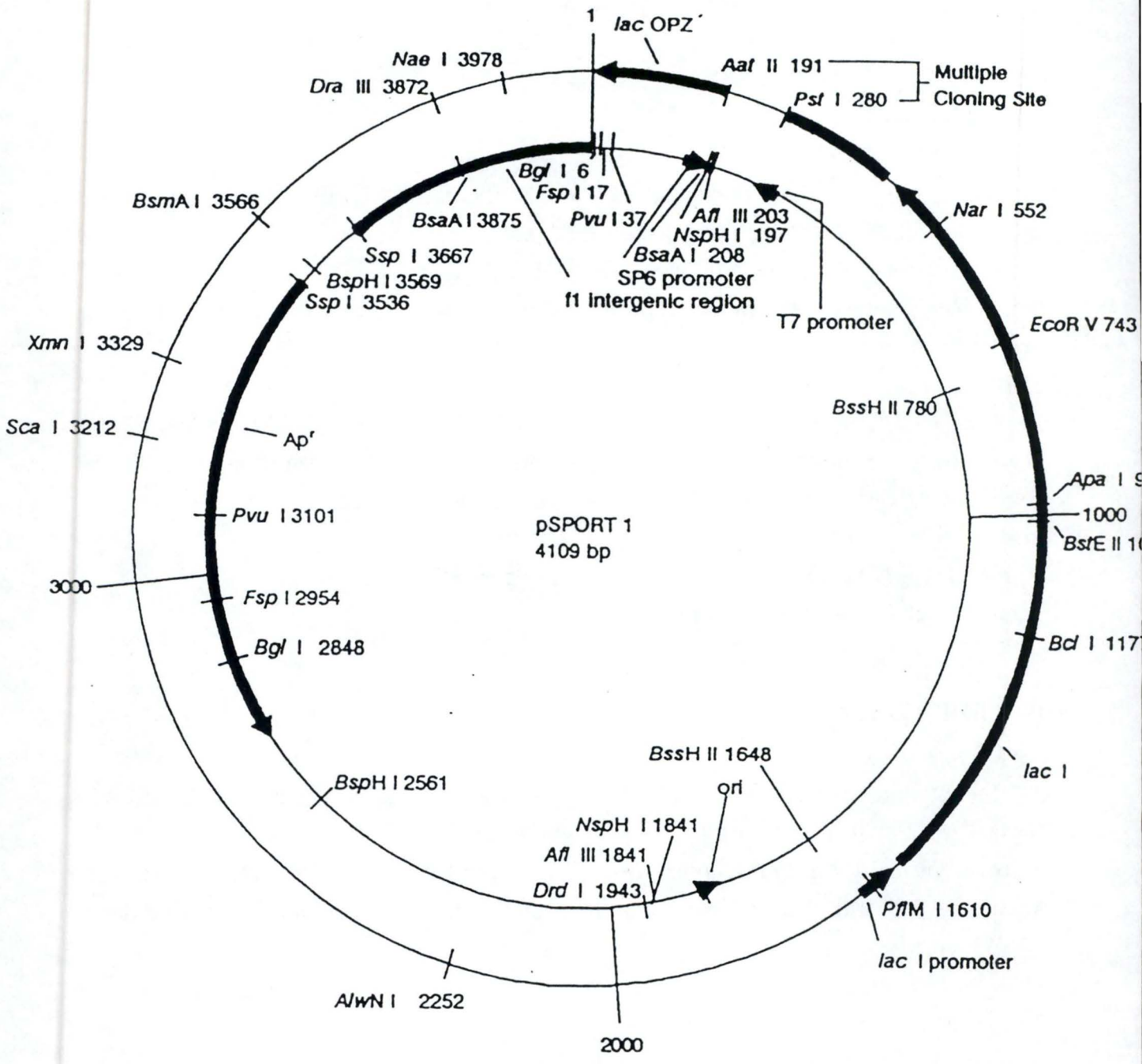


Figure 36: Carte de restriction du plasmide pSPORT 1 utilisé lors du clonage et du séquençage du fragment F5-6 de la chicorée.

- MC

Pour 1 l de milieu: 30 g sucrose; 4.708 g M & S medium (Murashige and Skoog Medium, basalt salt mixture including vitamins, DUCHEFA); 0.8 % Agar (bioMérieux); pH 5.8.

Autoclaver pour stériliser.

C) Souche bactérienne utilisée: E.Coli XL1-Blue.

Cette souche est particulièrement intéressante parce qu'elle permet un test colorimétrique simple de sélection des transformants (test blanc-bleu).

Le génotype de XL1-Blue au niveau du chromosome est: rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17, sup E44, rel A1, lac^-. L'épisome F', facteur de conjugaison bactérienne, possède les propriétés suivantes: pro AB^+, lac Iq, lacZΔM15, Tn 10.

rec A1: cette mutation permet de maintenir un plasmide stable au cours des générations successives.

end A1: mutation entraînant une diminution du taux d'endonucléase, ce qui améliore le rendement et la qualité de l'ADN plasmidique.

hsd R17: mutation dans un locus codant pour des endonucléases.

lac^-: délétion de l'opéron lactose, ce qui rend la souche incapable de métaboliser le lactose.

lac Iq : mutation dans le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose, ce qui entraîne sa surproduction d'un facteur dix.

lacZΔM15: le gène lac Z est délété dans la portion N-terminale de la β-galactosidase pour laquelle il code.

Tn 10: marqueur de résistance à la tétracycline permettant de sélectionner les bactéries qui possèdent bien l'épisome.

D) Plasmides.

Les plasmides utilisés communément possèdent trois caractéristiques fondamentales: une origine de réplication (ori) dans *E.coli*, un ou plusieurs marqueurs de sélection (souvent des gènes conférant la résistance à un antibiotique) et un site multiple de clonage (MCS) composé de nombreux sites uniques de restriction.

Nous avons utilisé le plasmide pSPORT1 (4109bp). Il est détaillé à la figure 36.

E) Antibiotiques.

- **Ampicilline**

Préparer une solution stock 10 mg/ml.

cc utilisée: 100 µg/ml de milieu.

Note: L'utilisation d'ampicilline permet de sélectionner les bactéries qui ont été transformées par un plasmide. En effet, ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline.

- **Tétracycline**

Préparer une solution stock 5 mg/ml.

cc utilisée: 10 µg/ml.

Note: Les colonies avec lesquelles nous travaillons sont tétracycline-résistantes. Cette résistance est portée par leur épisome F'.

F) Enzymes.

- **Eco RI** (Gibco BRL, 10 U/µl, à utiliser avec le tampon REact 3 10 X cc).
- **Hind III** (Gibco BRL, 10 U/µl, à utiliser avec le tampon REact 2 10 X cc).
- **Sma I** (Gibco BRL, 10 U/µl, à utiliser avec le tampon REact 3 10 X cc).
- **Ribonucléase de type A (RNase)** (Boehringer Mannheim, 10 µg/µl).
- **T4 DNA ligase** (Boehringer Mannheim, 1 U/µl, à utiliser avec le tampon ligase 10 X cc).
- **T4 DNA polymérase** (Amersham, 4 U/µl).
- **Expand^{TM} High Fidelity** (Boehringer Mannheim, 3.5 U/µl, à utiliser avec le tampon PCR 10 X cc contenant du $MgCl_2$).
- **TAQ DNA polymérase** (Boehringer Mannheim, 1 U/µl, à utiliser avec le tampon PCR 10 X cc contenant du $MgCl_2$).

II) Culture *in vitro* de plantules d'*Arabidopsis thaliana.*

Les graines nous ont été fournies par "the Nottingham Arabidopsis Stock Centre".

- Stériliser les graines pendant 20 minutes dans 1 ml d'eau de Javel 10 %.
- Rincer les graines dans 50 ml d'eau stérile.
- Récupérer les graines sur filtre stérile dans une boîte de Pétri.
- Ensemencer le milieu MC coulé dans des boîtes de Pétri (25 ml/boîte) avec les graines. Prélever les graines avec une pointe de scalpel stérile et les enfoncer d'un mm dans la gélose.
- Sceller les boîtes de Pétri et les placer en chambre thermostatisée à 25°C pendant 1 semaine.
- Après la germination, repiquer les embryons dans une boîte plus haute afin de favoriser la croissance en hauteur des plantes. A l'aide d'une pince stérile,

prélever les embryons des boîtes de Pétri et les repiquer dans les nouvelles boîtes en prenant soin de faire pénétrer les jeunes racines dans la gélose.
- Incuber en chambre thermostatisée à 25°C pendant 10 à 15 jours.
- Lorsque les explants ont atteint leur taille adulte (8 à 10 cm), les extraire des boîtes à l'aide d'une pince et les essuyer délicatement au niveau des racines pour les débarrasser au maximum de la gélose.
- Immédiatement plonger les explants dans l'azote liquide afin de les congeler et les stocker dans des Falcon à -70°C. Etablir le poids total des explants en pesant les Falcon avant et après les avoir remplis.

III) Techniques génétiques.

A) Manipulations courantes.

1.- Préparation de cellules électrocompétentes.

Note: les manipulations qui suivent doivent être effectuées stérilement, c'est-à-dire en utilisant des solutions autoclavées 20 minutes à 120°C et en travaillant sous hotte à flux laminaire.

Préculture:
- Introduire dans un Falcon :
  40 ml de LB
  100 µl de *E. Coli* XL1-Blue
  80 µl de Tétracycline (5mg/ml)
- Incuber une journée à 37°C sous agitation.

Culture:
- Préparer 1 litre de LB dans un Erlen.
- Ajouter au LB :
  la préculture
  2 ml de Tétracycline (5 mg/ml)
- Incuber toute une nuit à 37°C sous agitation.
- Le matin suivant, vérifier la densité optique à 600 nm. Elle doit être comprise entre 0.5 et 1.0.

Préparation des cellules:

- Placer la culture dans la glace pendant 15-30 minutes.
- Répartir la culture dans 4 tubes à centrifugation de 250 ml et centrifuger les bactéries à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Laver chaque culot bactérien dans 250 ml d'H_2O stérile à 4°C.
- Resuspendre les culots à la pipette.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant et rassembler les 4 culots dans 150 ml d'H_2O stérile à 4°C.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les bactéries dans 20 ml d'une solution stérile de glycérol 10 % dans un tube Falcon et recentrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans du glycérol 10% (volume final de 3 ml).
- Aliquoter les bactéries et les stocker à -70°C (100 µl/Eppendorf).

2.- *Transformation de bactéries par électroporation.*

Cette technique utilise un bref choc électrique pour permettre l'introduction d'ADN étranger à l'intérieur de cellules bactériennes.

- Introduire 2 µl de matériel plasmidique dans un Eppendorf contenant 100 µl de bactéries électrocompétentes et homogénéiser plusieurs fois à la pipette.
- Placer les bactéries dans une cuvette d'électroporation et les maintenir dans la glace pendant 5 minutes.
- Bien essuyer la cuvette et la placer entre les deux électrodes d'un *GenePulser* (BioRad, Belgium) équipé d'un *Pulse Controller* et de capacitances additionnelles.
- Electroporer les cellules dans les conditions suivantes: 25 µF, 12.5 kV/cm et 200 ohms.
- Ajouter le plus rapidement possible 1 ml de milieu SOC maintenu à température ambiante.
- Incuber les bactéries pendant 1 h à 37°C.
- Etaler 100 µl du mélange de transformation à la dilution désirée sur le milieu de sélection adéquat.

3.- Sélection des transformants et des recombinants.

Principe:

L'ampicilline permet de sélectionner les bactéries qui ont été transformées par un plasmide portant le marqueur AMP^r. Ce gène code pour la β-lactamase, une enzyme excrétée dans l'espace périplasmique et qui dégrade l'ampicilline.

La sélection des recombinants (bactéries transformées par un plasmide porteur de l'insert d'intérêt) s'effectue à l'aide du test blanc-bleu qui se base sur la propriété de complémentation intragénique.

La souche XL1-Blue, déficiente pour la β-galactosidase, possède un épisome F' porteur du gène codant pour la partie C-terminale inactive α' de la β-galactosidase. Les plasmides que nous avons utilisés sont, entre autres, porteurs d'un fragment lac Z' codant pour l'extrémité N-terminale inactive α de la β-galactosidase. La complémentation intragénique consiste en l'assemblage des peptides α et α' inactifs, ce qui génère une enzyme β-galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est alors capable de cliver le Xgal, un analogue du lactose, en un chromogène bleu.

Par construction, le site multiple de clonage des plasmides a été inséré en phase dans une région peu importante pour l'activité β-gal, ce qui maintient la propriété de complémentation. Par contre, lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans le MCS, l'ORF de la portion lac Z' est disruptée et le peptide α n'est plus synthétisé. Les bactéries transformées par de tels vecteurs (recombinants) donnent naissance à des colonies blanches puisqu'elles sont incapables de cliver le Xgal, alors que les bactéries transformées par des vecteurs refermés sur eux-mêmes donnent des colonies bleues.

Les bactéries sont cultivées sur un milieu contenant de l'IPTG, inducteur de l'expression de la β-galactosidase.

Protocole:

- A l'aide d'un rateau, étaler sur boîte LBA: 250 µl solution stock Ampicilline, 40 µl de solution stock X-Gal et 35 µl de solution stock IPTG. Veiller à ce que les solutions ainsi étalées aient bien pénétré le milieu: il faut continuer à exercer des mouvements rotatifs avec le rateau tant que la surface du milieu n'est pas totalement sèche.

Notes: a) préparer une solution stock 2 % X-Gal dans du diméthylformamide (conserver à 4°C dans un tube entouré de papier aluminium car le X-Gal est sensible à la lumière). b) préparer une solution stock d'IPTG 100 mM en

dissolvant 1 g dans 42 ml H_2O (filtrer sur 0.22 µm, scinder la solution en aliquotes de 1 ml et stocker à - 20°C).
- Etaler au rateau 100 µl de bactéries transformées (à la dilution désirée).
- Incuber les boîtes à 37°C pendant une nuit.
- Repérer les colonies blanches et les repiquer sur boîte LBA + Ampicilline + X-Gal + IPTG en évitant de prélever les colonies-satellites.
- Incuber pendant une nuit à 37°C et vérifier l'efficacité de la sélection.

4.- Préparation d'ADN plasmidique (miniprep).

Cette technique permet de purifier les plasmides produits par *E. coli* en les séparant de l'ADN génomique et des protéines.

Préculture à partir de colonies isolées.
A ce niveau, il est important de travailler stérilement afin d'éviter le développement de contaminants.
- Introduire 3 ml de LB + 30 µl solution stock Ampicilline dans un tube Falcon de 15 ml.
- A l'aide d'un cure-dent stérile, piquer dans une colonie et inoculer le milieu.
- Incuber 24 h à 37°C sous agitation.

Miniprep.
- Prélever 1.4 ml de bactéries dans un Eppendorf et centrifuger 1 min à 13.000 rpm.
- Aspirer le surnageant à la trompe à vide et recommencer une deuxième fois l'opération qui précède.
- Resuspendre le culot bactérien à la pipette dans 200 µl de Tampon A et y introduire ensuite 24 µl de lysozyme (10mg/ml).
- Vortexer légèrement et incuber 5 min à T° de la pièce.

Note: Le lysozyme sert à perméabiliser la paroi externe des bactéries en coupant les liaisons entre acides N-acétylmuramiques et N-acétylglucosamines. On peut ainsi récupérer l'ADN plasmidique à l'extérieur des bactéries. Il faut veiller à ce que le contact ne soit pas trop long entre les bactéries et le lysozyme, sans quoi l'on risque de contaminer l'ADN plasmidique par de l'ADN génomique.
C'est pourquoi, s'il y a plusieurs échantillons à traiter, on n'ajoutera le lysozyme qu'au dernier moment, après avoir homogénéisé tous les échantillons dans le Tampon A.

- Placer les Eppendorfs ouverts dans un Bain-Marie bouillant pendant 1 min 30sec.
- Centrifuger 15 min à 13000 rpm à T° ambiante.
- Enlever le culot bactérien à l'aide d'un cure-dent non-stérile. Il contient l'ADN génomique et les protéines bactériennes.
- Ajouter au surnageant 8 µl de CTAB 5% p/v.
- Vortexer afin de précipiter les acides nucléiques.
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm à T° ambiante.
- Eliminer le surnageant à la trompe à vide et ajouter au culot 300 µl de NaCl 1 M.
- Vortexer, incuber 5 min à 56°C et vortexer à nouveau.
- Ajouter 300 µl de phénol:chloroforme:acide isoamylique (25:24:1) (SIGMA) et centrifuger 2 min à 13000 rpm à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure dans un Eppendorf autoclavé. Y ajouter 750 µl d'éthanol 96% et précipiter à - 70°C pendant 20 min.
- Centrifuger 15 min à 13000 rpm à 4°C et éliminer le surnageant à la trompe à vide.

Note: aspirer le surnageant délicatement sinon on risque d'aspirer le culot en même temps.

- Rincer le culot dans de l'éthanol 75 % stocké à - 20°C. Inverser le tube deux-trois fois afin de décrocher le culot de la paroi du tube.
- Centrifuger 2 min à 13000 rpm à 4°C.
- Eliminer le surnageant à la pipette et sécher le culot pendant 10 min au speed-vac.
- Resuspendre le culot dans 30 µl de TE contenant 1 µl de RNase.
- Incuber 1 h à 37°C et stocker à - 20°C.

5.- Extraction au phénol.

Afin d'extraire les protéines d'une solution d'ADN, on utilise le phénol, solvant non-miscible à l'eau. Les protéines précipitent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. Cette opération s'effectue entre deux restrictions ou entre une restriction et une ligation.

Protocole-type:

- Porter à 100 µl le volume de la solution d'ADN avec de l'eau pure.
- Ajouter 100 µl de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1)
- Vortexer et centrifuger 5 min à la microfuge.
- Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface phénol-eau.

6.- Précipitation à l'éthanol.

Il est souvent nécessaire de concentrer une solution d'ADN, par exemple après une extraction au phénol. A cet effet, on précipite l'ADN pour le resuspendre dans un volume inférieur.

Protocole-type:

- Ajouter à la solution d'ADN 1/10 v/v d'acétate de sodium 3 M, pH 5.2, ainsi que 2.5 v/v de départ d'éthanol 96%.
- Mélanger par retournement.
- Placer pendant 20 min à -20°C.
- Centrifuger à la microfuge pendant 15 min.
- Enlever le surnageant en prenant garde au culot (invisible la plupart du temps).
- Ajouter 3.6 v/v de départ d'éthanol 75% (déssalage).
- Centrifuger à la microfuge pendant 10 min.
- Eliminer le surnageant.
- Sécher complètement le culot au speed-vac.
- Resuspendre l'ADN précipité dans le volume désiré d'eau pure ou de TE.

7.- Restriction d'ADN purifié.

Les enzymes de restriction permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique: elles reconnaissent un site de restriction qui leur est spécifique, constitué d'une séquence palindromique de 4 ou de 6 paires de bases. Une coupure droite génère des "bouts francs" tandis qu'une coupure en escalier génère des "bouts collants". Après restriction, les fragments d'ADN obtenus possèdent un groupement phosphate du côté 5' et un groupement hydroxyle du côté 3'.

En pratique, la réaction s'effectue dans un volume final de 20 µl:

- ADN à restreindre
- 2 µl du tampon de restriction 10 X cc
- 1 µl enzyme de restriction
- porter à volume avec de l'eau stérile et incuber une heure à 37°C.

Les enzymes et les tampons qui les accompagnent sont détaillés au point 1.6.

Dans le cas d'une double restriction *Hind* III-*Eco* RI on utilisera le tampon React 3.

8.- Ligation.

Cette technique utilise l'enzyme T4 DNA ligase afin de lier entre eux deux fragments d'ADN. La ligase catalyse la formation de liens phosphodiesters entre un groupement hydroxyle en 3' et un groupement phosphate en 5'.
La réaction nécessite un ADN purifié des protéines et des sels qui pourraient le contaminer. Une extraction au phénol et une précipitation de l'ADN sont donc nécessaires entre une restriction et une ligation.

Placer dans un Eppendorf:
- le vecteur linéarisé et le fragment à intégrer dans un rapport molaire de 1/2,5
- 2 µl de T4 DNA ligase (1U/µl)
- 2 µl de tampon 10 X cc
- porter à 20 µl avec de l'eau stérile

Pour des bouts collants on incubera une nuit à 22°C, ce qui favorise la formation des ponts hydrogène entre bases nucléotidiques complémentaires. Dans le cas des bouts francs où il n'y a pas d'intervention de ponts hydrogène, une incubation de 3 heures à température ambiante est préférable car dans ces conditions l'activité de l'enzyme est plus importante.

9.- Dosage des acides nucléiques.

a) Dosage de l'ARN au spectrophotomètre.

Le dosage est réalisé en faisant une mesure de la densité optique (DO) de l'échantillon d'ARN à 260 nm. Une DO de 1 est obtenue pour 40 µg d'ARN, il suffit donc de faire une simple règle de trois à partir de la lecture d'absorbance pour déterminer la quantité d'ARN dans l'échantillon.
En outre, on peut aussi effectuer un scan qui permet d'évaluer la pureté de l'échantillon par rapport à des contaminations par des protéines (DO: 280 nm) ou par des polysaccharides (DO: autour de 190 nm).

Protocole:
- rincer la cuvette en quartz dans du NaOH 1 N et ensuite dans de l'eau-DEPC.
- faire une baseline sur 1 ml de tampon (eau-DEPC ou BB).
- introduire 1 ml de tampon dans la cuvette et y ajouter 1 µl d'échantillon d'ARN. Faire un scan entre 190 nm et 300 nm.

Notes : 1°) le volume d'échantillon introduit dans la cuvette peut être augmenté afin d'obtenir une valeur d'absorbance significative; 2°) lors du dosage de l'ARN messager après passage sur colonne oligo-dT, on doit introduire tout l'échantillon dans la cuvette et le récupérer ensuite: c'est pourquoi il est nécessaire de bien rincer la cuvette au NaOH afin d'éviter toute dégradation de l'ARNm par des RNases.

b) Dosage de l'ADN plasmidique par fluorimétrie.

L'ADN double-brin est dosé au moyen d'un agent intercalant, l'HOECHST 33258, qui s'incère spécifiquement entre les bases A et T.
Le dosage est effectué au moyen d'un fluoromètre (HOEFER TKO 102).

Notes:

a) en raison de sa toxicité, il est important de mettre des gants lorsque l'on travaille avec l'HOECHST.

b) la solution TNE + HOECHST qu'il faut protéger de la lumière, ne se conserve qu'un jour.

c) il existe deux échelles de mesure:

- entre 10 et 500 ng d'ADN: dans ce cas, il faut utiliser la solution de TNE 1 X + HOECHST 0.1 µg/ml ainsi que la solution d'ADN de thymus de veau 100 ng/µl. Le scale se règle sur 100 (voir calibration).
- entre 100 et 2000 ng d'ADN: dans ce cas, il faut utiliser la solution de TNE 1 X + HOECHST 1 µg/ml ainsi que la solution d'ADN de thymus de veau 1000 ng/ml. Le scale se règle sur 1000 (voir calibration).

<u>Calibration de l'appareil (pour l'échelle 100 ng à 2000 ng):</u>

- Régler l'appareil sur 000 (bouton ZERO) en introduisant 2 ml de tampon TNE + HOECHST dans la cuvette (le "G" toujours positionné vers l'avant) .
- Régler l'appareil sur 1000 (bouton SCALE) avec 2 ml de TNE + HOECHST + 2 µl de la solution d'ADN de thymus de veau.

Note: bien homogénéiser par inversion avant d'effectuer le SCALE.

- Recommencer les deux opérations qui précèdent, en veillant à bien nettoyer la cuvette à l'eau désionisée entre chaque mesure.

Dosage proprement dit:

- Refaire un ZERO.
- Introduire ensuite 2 µl de l'échantillon dans la cuvette et mélanger par inversion avant de faire la lecture. La valeur indiquée correspond à une concentration en ADN exprimée en ng/µl d'échantillon.

Note: bien rincer la cuvette à l'eau désionisée avant de faire la mesure suivante.

10.- Electrophorèse en gel d'agarose.

Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN suivant leur taille. La co-migration avec un marqueur de taille permet d'estimer la taille des fragments et la quantité d'ADN mise sur gel.

Protocole:

- Préparer le volume de gel souhaité (50 ou 300 ml suivant la taille de la cuve de migration): dissoudre 0.8 à 1 % (w/v) d'agarose dans du TAE 1X. Chauffer quelques minutes jusqu'à transparence de la solution.
- Laisser refroidir quelques minutes sous agitation.
- Couler le gel dans la cuve, en plaçant correctement le peigne destiné à former les puits. L'agarose se gélifie en refroidissant.
- Ajouter immédiatement de 10 à 25 µl de bromure d'éthidium (2 mg/ml) dans le gel, mélanger avec la pipette.
- Laisser le gel se solidifier au moins 20 minutes.
- Immerger le gel complètement dans la cuve de migration contenant du tampon TAE 1X.
- Charger le gel: environ 10 µl de solution d'ADN + 2 µl de Bleu de bromophénol par puits.
- Migration: environ 1 h, sous 80 mA et voltage variable. L'ADN, chargé négativement, migre vers la borne positive. Il fixe le bromure d'éthidium, qui devient alors visible par fluorescence, après exposition aux ultra-violets.
- Photographier le gel sous lumière ultra-violette.

11.- Récupération de bande d'ADN sur gel d'agarose.

Principe:

Le kit QIAEX II de Qiagen permet de récupérer des fragments d'ADN après séparation par électrophorèse sur un gel d'agarose. L'agarose contenant l'ADN est dissous et l'ADN est absorbé sur des particules de silica-gel en présence de fortes concentrations en sels. L'ADN est ensuite élué grâce à une solution à faible

force ionique (tampon TRIS, par exemple). Les tampons QX1 et PE sont fournis avec le silica-gel.

Protocole:

-Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose.
- Ajouter 3 volumes de tampon QX1 par volume de gel.
- Vortexer 20 sec pour resuspendre les particules de silica-gel QIAEX II.
- Ajouter 10 µl QIAEX II à la solution d'agarose. Incuber à 50°C pendant 10 min en agitant toutes les 2 min.
- Centrifuger 30 sec et enlever le surnageant.
- Laver le culot avec 500 µl de tampon QX1.
- Laver le culot deux fois avec le tampon PE. Enlever complètement le surnageant.
- Sécher le culot pendant 10-15 min.
- Ajouter 20 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5 et laisser incuber 5 min.
- Microcentrifuger 30 sec et récupérer le surnageant contenant l'ADN purifié.

B) Construction d'une banque d'ADNc.

1.- Extraction d'ARN total.

Recommandations: à ce niveau, il est important de prendre toutes les mesures possibles pour éviter les contaminations par les RNases. C'est pourquoi, il est nécessaire de travailler avec des gants, d'utiliser du matériel RNases-free (soit lavé dans du NaOH 1 N, soit autoclavé 20 minutes à 120°C) et de n'utiliser que des solutions préparées avec de l'eau traitée au DEPC (un puissant inhibiteur des RNases).

a) Broyage des explants d'*A. thaliana*.

- broyer les plantules d'A. *thaliana* congelées dans l'azote liquide dans un mortier cuit minimum 4 heures à 150°C et refroidi ensuite à -70°C.
- ajouter de l'azote liquide dans le mortier et continuer à moudre juqu'à l'obtention d'une fine poudre.
- transvaser la poudre dans un tube Falcon de 50 ml.

b) Extraction au chlorure de lithium.

1) préparer une solution de RBA : phénol (1:1) et la mettre à chauffer à 90°C. Ajouter 2 ml de cette solution/gr de poudre.
2) homogénéiser le mélange à l'ultra-turrax (mèche RNases-free) afin d'obtenir une solution laiteuse dépourvue d'agglomérats. La température finale de cette solution doit être de 25-30°C.
3) ajouter 1 ml de chloroforme/gr de poudre et agiter 15 à 30 minutes sur un agitateur rotatif à température ambiante.
4) centrifuger à 4000 rpm pendant 30 minutes à 25°C.
5) récupérer la phase aqueuse supérieure et y ajouter 1 ml de chloroforme/gr de poudre de départ. Agiter 15 minutes sur un agitateur rotatif à température ambiante.
6) centrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes à 25°C.
7) récupérer la phase aqueuse supérieure et en mesurer le volume. Ajouter 1/3 de volume de LiCl 8 M. Mélanger vigoureusement et précipiter l'ARN à 4°C pendant 16 à 48 heures.
8) centrifuger 30 minutes à 4000 rpm à 4°C.
9) éliminer le surnageant et rincer le culot d'ARN dans 1 ml de LiCl 2 M. Récupérer le culot et le LiCl dans un Eppendorf. Centrifuger à 10000 rpm à 4°C.
10) éliminer le surnageant et rincer le culot à deux reprises dans de l'éthanol 80 %
.
11) centrifuger à 10000 rpm et éliminer le surnageant.
12) faire sécher le culot à l'air pendant 1 heure.
13) resuspendre le culot dans un volume minimal d'eau RNases-free et stocker à -70°C.
14) doser l'ARN à 260 nm et contrôler son aspect sur gel d'agarose 1%.

c) Elimination des polysaccharides par précipitation à l'éthanol.

protocole adapté de Michaels *et al.* (1994).
Cette étape consiste à faire précipiter les polysaccharides dans de l'éthanol 35 % alors que l'ARN reste en solution.
- ajouter au culot d'ARN (obtenu au point 10 de l'extraction au LiCl) 0.35 volume d'éthanol 100 % tout en agitant.
Note: l'agitation de l'échantillon permet d'éviter qu'il y ait des concentrations locales en éthanol supérieures à 35 %, ce qui ferait précipiter l'ARN en même temps que les polysaccharides.
- incuber sur glace pendant 20 minutes.
- centrifuger à 10000 rpm pendant 10 minutes.
- récupérer le surnageant, le culot gélatineux contient les polysaccharides.

- ajouter un volume d'isopropanol et incuber 15 minutes à température ambiante.
- centrifuger 5 minutes à 10000 rpm et éliminer le surnageant.
- rincer deux fois le culot avec 1 ml d'éthanol 80% puis 100%.
- vider le surnageant et laisser sécher le culot d'ARN à l'air.
- resuspendre dans un volume minimal d'eau RNases-free et stocker à -70°C.

d) Elimination des polysaccharides dans un gradient de CsCl.

protocole adapté de Sambrook *et al.* (1989).
- déposer 12 ml d'une solution de CsCl 5.7 M; EDTA 0.01 M; DEPC 0.01% dans un tube à centrifugation. Repérer à l'aide d'un marqueur indélébile la hauteur du coussin de CsCl.
- resuspendre l'échantillon (obtenu au point 7 de l'extraction au LiCl) dans de l'eau-DEPC pour atteindre un volume total de 26.5 ml. Introduire délicatement cette solution sur le coussin de CsCl en penchant le tube.
- centrifuger 26 heures à 23000 rpm à 20°C dans un rotor SW28.
Note: couper le frein pour éviter toute perturbation du gradient lors de l'arrêt de la centrifugation.
- enlever délicatement les tubes de la centrifugeuse en évitant de perturber le gradient. Tracer un repère à environ 0.5 cm du fond du tube.
- à l'aide d'une pipette Pasteur, éliminer tout le fluide présent au-dessus de la première marque: il contient l'ADN ainsi que les polysaccharides.
- éliminer précautionneusement le liquide présent au-dessus de la seconde marque.
- rincer le culot d'ARN dans 1 ml d'éthanol 70% afin d'éliminer tout le CsCl encore présent.
- transvaser l'ARN dans un Eppendorf et incuber 1 heure à 4°C.
- centrifuger 15 minutes à 13000 rpm à 4°C et éliminer le surnageant. Laisser sécher le culot à l'air.
- dissoudre le culot dans 150 µl de TE-SDS 0.1%, pH 7.6.
- ajouter 30 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5.2 et 900 µl EtOH 100% maintenu à 4°C.
- bien mélanger et incuber à 4°C pendant au moins 30 minutes.
- centrifuger à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et éliminer le surnageant.
- rincer le culot avec de l'éthanol 70% et centrifuger 10 minutes à 10000 rpm à 4°C.
- éliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air pendant 1 heure.
- resuspendre le culot dans un volume minimal d'eau-DEPC et stocker à -70°C.

e) Extraction d'ARN total au Trizol Reagent

- Transférer le broyat d'*A.thaliana* dans un tube Falcon de 50 ml et y ajouter 15 ml de Trizol (1 ml de Trizol pour 100 mg de cellules).

Note : Eviter tout dégel des cellules entre le broyage et l'homogénéisation au Trizol. Lors du dégel des cellules, le Trizol protègera l'ARN de l'action des RNases libérées des différents compartiments cellulaires lors du broyage.

- Laisser le mélange revenir à T° ambiante.
- Centrifuger à 12000 g pendant 10 min à 4°C (centrifugeuse Beckman J2-21, rotor JA 20,10000 rpm).
- Récupérer le surnageant (le culot contient des polysaccharides, membranes, DNA,...).
- Ajouter au surnageant 3 ml de chloroforme (0.2 ml de chloroforme par ml de Trizol) et mélanger vigoureusement pendant 15 secondes.

Note : le chloroforme sert à séparer la solution en deux phases, une phase organique et une phase aqueuse qui contient l'ARN.

- Incuber le mélange 2-3 min à T° de la pièce.
- Centrifuger à 12000 g pendant 15 min à 4°C (10000 rpm, rotor JA20, centrifugeuse Beckman J2-21).
- Récupérer la phase aqueuse supérieure en évitant de toucher à l'interface.
- Précipiter l'ARN avec 7.5 ml d'isopropanol (0.5 ml d'isopropanol par ml de Trizol).
- Incuber 10 min à T°de la pièce.
- Centrifuger à 12000 g pendant 10 min à 4°C (10000 rpm, rotor JA20, centrifugeuse Beckman J2-21).
- Eliminer le surnageant et laver le culot d'ARN dans 15 ml d'EtOH 75% (1 ml d'EtOH par ml de Trizol).
- Mélanger en vortexant ou en agitant vigoureusement afin de dissocier complètement le culot.
- Centrifuger à 7500 g pendant 5 min à 4°C (8000 rpm, rotor JA20, centrifugeuse Beckman J2-21).
- Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air libre.
- Dissoudre le culot dans un volume minimal de BB en le resuspendant à la pipette et en incubant 10 min à 55-60°C.
- Doser l'ARN au spectro (voir point 3.1.9.1).

2.- *Purification d'ARN messager.*

Principe:

Les ARN messagers sont purifiés par chromatographie d'affinité, grâce au fait qu'ils possèdent une queue de poly-A à leur extrémité 3'. Des poly-T fixés de manière covalente à une colonne de cellulose lient les queues de poly-A et retiennent ainsi les ARNm. Après lavage, les ARNm sont élués en augmentant la force ionique du tampon. Afin d'obtenir une préparation d'ARN enrichie à plus de 90 % en ARNm, il est conseillé d'effectuer un deuxième passage de l'échantillon sur la colonne.

Protocole:

- Préparer la colonne de cellulose oligo(dT) (GIBCO-BRL) sur un statif.
- Charger la colonne avec 1 ml de NaOH 0.1 M et laisser s'écouler.
- Equilibrer la colonne avec 4 ml de BB conservé à température ambiante.
- Charger la colonne avec 1 ml de BB et laisser s'écouler 0.5 ml. La colonne est à présent prête à l'usage.
- Ajouter 3 ml de BB au culot d'ARN total isolé précédemment. Dissoudre l'ARN à la pipette.
- Chauffer la solution d'ARN à 70°C pendant 5 min puis mettre sur glace 5 min.

Note: si le SDS présent dans le BB précipite au contact du froid, éliminer les particules insolubles par une brève microcentrifugation.

- Charger au maximum 20 mg d'ARN total sur la colonne. Laisser s'écouler. Laver avec 4 ml de BB pour éluer les ARN non-messagers.
- Eluer les ARN messagers avec 1,5 ml d'EB et collecter la fraction dans un tube de 15 ml (éluat 1).
- Equilibrer de nouveau la colonne avec 4 ml de BB.
- Chauffer l'éluat 1 à 70°C pendant 5 min puis mettre sur glace pendant 5 min.
- Placer la solution d'ARN à température ambiante pendant 20 min. Ensuite, y ajouter 90 µl de NaCl 5M et la déposer immédiatement sur la colonne.
- Laver la colonne avec 4 ml de BB.
- Eluer les ARNm avec 1,5 ml d'EB et collecter cette fraction dans un tube de 15 ml (éluat 2).
- Doser l'échantillon au spectro (voir point 3.1.9.1) et le récupérer ensuite.
- Y ajouter 90 µl de NaCl 5M et 3 ml d'éthanol 96%. Placer le tube à -20°C au moins une nuit.
- Centrifuger l'échantillon à 13000 g pendant 20 min à 4°C et éliminer le surnageant.
- Ajouter précautionneusement 1 ml d'éthanol au culot et centrifuger 5 min à 13000 g à 4°C.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot à température ambiante.

- Resuspendre le culot dans un volume minimal (5 à 50 µl) dans une solution d'EDTA 1mM pH 7,5 traitée au DEPC. Stocker à -70°C.

C) Amplification par PCR.

1.- Principe.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est un moyen de synthèse enzymatique *in vitro* d'une séquence déterminée d'ADN. La réaction utilise deux primers oligonucléotidiques, un primer gauche et un primer droit, qui s'hybrident sur les deux brins complémentaires et flanquent ainsi la séquence à amplifier. L'élongation des primers est réalisée par une DNA polymérase thermorésistante, la TAQ polymérase. Une série de cycles répétitifs comprenant la dénaturation de la séquence matrice (ou cible), l'hybridation des primers et l'extension de ceux-ci grâce à la TAQ permet l'accumulation exponentielle du fragment spécifique. A chaque cycle, le nombre de fragments d'ADN-cible double; en effet, chaque produit d'extension des primers à un cycle donné peut à son tour servir de matrice au cycle suivant. Les limites du fragment amplifié sont définies par les extrémité 5' des primers.

2.- Protocole-type.

- Dans un Eppendorf PCR, ajouter:
  - 400 ng d'ADN cible.
  - 5 µl de dNTP mix 10X.
  - 100 pmoles de chacun des primers.
  - 5 µl de tampon PCR (fourni avec l'enzyme) 10X cc.
  - porter à 49 µl avec de l'eau pure.
  - ajouter 1 µl de TAQ polymérase (1 U/µl).
- Placer l'Eppendorf dans un Thermo Cycler PCR et effectuer les cycles.

Exemple: 1 min à 95°C de dénaturation initiale suivie de 34 cycles: 30 sec à 95°C (dénaturation) + 1 min à 50°C (hybridation) + 3 min à 72°C (élongation).

Note: la température d'hybridation est dictée par le T_m[15] des primers.

---

[15]Par définition, le T_m (température de melting) est la température à laquelle 50% de l'ADN est dénaturé. Le T_m est déterminé par la proportion de G et de C présents dans la double-hélice.

3.- Rapid Amplification of 5'- and 3'-cDNA Ends (5'- et 3'-RACE).

Principe:

La 5'-RACE consiste à amplifier un fragment d'ADNc compris entre un primer AP1 qui se liera au niveau de l'adaptateur 5'[16] et un primer spécifique du fragment d'intérêt (gene specific primer, GSP1).

Le fragment amplifié lors de la 3'-RACE est compris entre le primer AP1 lié au niveau de l'adaptateur 3' et le GSP2.

Les adaptateurs sont particuliers à deux points de vue: 1°) leur extrémité 5' protrudante contient une séquence identique (mais non-complémentaire) au primer AP1; 2°) leur extrémité 3', en retrait par rapport à leur extrémité 5', n'offre pas de site de liaison pour le primer AP1 et contient un groupe NH_2 terminal qui empêche l'extension de cette extrémité. Dès lors, la seule manière d'amplifier un fragment compris entre les deux primers AP1 et GSP1 consiste à créer un site de liaison pour AP1 par polymérisation depuis le GSP1 au cours du premier cycle d'amplification.

Protocole:

- Dans un Eppendorf pour PCR, préparer:
  - 1 µl dNTP 10 mM
  - 1 µl primer AP1 10 µM
  - 1 µl GSP (10 µM ou 100 µM)
  - 2.5 µl tampon PCR 10 X cc
  - 19.5 µl H_2O
- Faire chauffer à 70°C huile DyNA Wax (Tech Gene International) et déposer 30 µl d'huile liquide dans le tube PCR.
- Au-dessus de l'huile solidifiée, déposer:
  - 2.5 µl tampon PCR 10 X cc
  - 5 µl ADNc (environ 2 ng)
  - 0.7 µl expanded enzyme (3.5 U/ µl)
  - 16.8 µl H_2O
- Placer l'Eppendorf dans un Thermo Cycler PCR et réaliser l'amplification dans les conditions suivantes:
  - 94°C pendant 1 minute

---

[16]Par définition, l'adaptateur 3' est situé du côté de la queue poly-(AT) de l'ADNc. L'adaptateur du côté opposé est appellé adaptateur 5'.

N cycles (94°C pendant 30 secondes, 45°C pendant 30 secondes et 68°C pendant 5 minutes).

Note: le nombre optimal de cycles nécessaires pour chaque amplification est à déterminer expérimentalement. Classiquement, ce nombre tourne autour de 25-30 cycles.

D) Séquençage.

Principe:

Le séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger est basé sur la capacité d'une DNA polymérase d'étendre un primer jusqu'à ce qu'un didéoxynucléotide soit incorporé dans la chaîne. L'ensemble des produits de polymérisation interrompus est séparé par un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. La séquence de l'ADN est déduite du pattern de migration observé après révélation du gel.

Le CircumVent™ Phototope™ Kit de BioLabs élimine le besoin pour la révélation du gel d'utiliser des nucléotides ou des primers radioactifs. Les primers utilisés lors de ce séquençage sont biotinylés. Avant la révélation, l'ADN est transféré sur une membrane de Nylon. Ensuite, on lave la membrane avec une solution de streptavidine qui se lie à la biotine. Un complexe biotine-phosphatase alkaline se lie ensuite à la streptavidine. La phosphatase catalyse une réaction dont les produits émettent de la lumière. La visualisation du pattern des bandes est réalisée grâce à l'impression d'un film rayon-X par la lumière émise.

1.- Réaction de séquençage.

Nous avons utilisé 2 primers universels s'hybridant de part et d'autre du site multiple de clonage de pSPORT.

- Préparer 4 tubes PCR numérotés A, C, G, T.
- Ajouter respectivement 3 µl de mixture A, C, G et T (CircumVent deoxy/dideoxy Sequencing mixes) au fond des tubes correspondants.
- Mélanger doucement dans un Eppendorf (E):

    1 µl de la construction à séquencer (0.02 pmole/µl)

    2 µl de primer biotinylé à l'extrémité 5' (0.6 pmole/µl).

    1.5 µl de tampon CircumVent Sequencing Buffer 10X.

    1 µl de solution Triton X-100 30X.

    porter à 14 µl avec de l'eau pure.

- Ajouter au tube E, 2 unités de $Vent_r$ (exo-) DNA polymerase et mélanger doucemement à la pipette.
- Ajouter rapidement 3,2 µl de cette solution dans chacun des tubes A, C, G, T. Mélanger doucement à la pipette. Changer d'embout à chaque tube.
- Placer les tubes dans un appareil à cycle thermique.
Paramètres: 30 cycles avec 95°c pendant 20 sec, 55°C pendant 1 min, 72°C pendant 1 min. Terminer à 20°C.
- Ajouter 4 µl de Stop/Loading Dye Solution à chaque tube.
- Charger le gel immédiatement ou stocker à -20°C.

2.- *Electophorèse en gel de polyacrylamide.*

a) Préparation des plaques.

1) sous hotte aspirante, laver la plus petite des deux plaques avec du Repelsilane (silanisation) et laisser sécher. Rincer abondamment la plaque à l'eau de ville, puis à l'eau désionisée.
2) rincer les deux plaques à l'éthanol.
3) placer la grande plaque à plat et y déposer les spacers avant de la recouvrir avec la petite plaque, le côté silanisé en contact avec les spacers.
4) sceller les plaques à l'aide d'adhésif sur les bords latéraux et sur le bord inférieur tout en les maintenant jointes grâce à des pinces.

b) Préparation du gel.

- Ajouter dans un Erlenmeyer:
    48 ml d'ULTRA PURE SEQUAGEL™-6 (BIOZYM).
    12 ml d'ULTRA PURE SEQUAGEL™ Complete Buffer Reagent (BIOZYM)..
    480 µl d'APS 10 %.
- Agiter le mélange et couler sans tarder le gel en penchant l'Erlen au sommet des deux plaques de manière à avoir un débit constant. Eviter absolument la formation de bulles.
- Placer les peignes, le côté plat en contact avec le gel. Enfoncer les peignes de quelques mm dans le gel en veillant à ce qu'ils soient bien droits, afin de garantir un front de migration régulier. Installer des pinces au niveau des peignes pour les immobiliser.
- Laisser polymériser 30 minutes.
- Eliminer avec une spatule le polyacrylamide excédentaire n'ayant pas polymérisé au contact de l'air. Oter les peignes et rincer plusieurs fois au TBE 1X cc le sommet du gel.

- Installer les plaques dans la cuve à électrophorèse verticale (Modèle S2, Life Technologie, GIBCO BRL) et installer les peignes, dents vers le bas, en contact avec le gel.
- Remplir de TBE 1X cc les deux réservoirs: 500 ml dans celui du haut et 300 ml dans celui du bas.

c) Migration des échantillons.

- Faire une pré-migration d'une demi-heure dans les conditions suivantes: 1.8 kV, 200 A et 190 W.
- Avant la fin de la pré-migration, placer les échantillons 5 min à 85°C puis les stocker à 2°C.
- Avant de charger le gel, enlever l'urée des puits car elle empêche une pénétration uniforme des échantillons dans le gel.
- Charger 2,5 µl par puits des échantillons A, G, C, T dans l'ordre.
- Faire migrer dans les mêmes conditions que la pré-migration pendant le temps nécessaire.

Note: faire migrer environ 2H00 pour lire jusqu'à 100 nucléotides du primer et 4H00 pour lire jusqu'à 200 nucléotides du primer.

3.- Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon.

Principe: le transfert de l'ADN sur une membrane de Nylon est effectué par capillarité entre des papiers Whatman mouillés dans du TBE et des papiers Whatman secs.

Protocole:

- Découper:
  - huit papiers Whatman 3MM et une membrane de Nylon dont les dimensions sont : largeur égale à la largeur du peigne + 2 cm et longueur de 30 cm
  - un grand papier Whatman de 41 cm X 30 cm
- Laisser refroidir les plaques après la migration.
- Déposer les plaques à plat (grande plaque vers le bas), enlever les peignes et les spacers.
- A l'aide d'une fine spatule, soulever la petite plaque (le gel reste accroché à la grande plaque).
- Déposer 4 Whatman imbibés de TBE 0,5X cc sur la petite plaque.
- Déposer le grand Whatman sur le gel. Le gel doit adhérer au Whatman (tapoter délicatement toute la surface du Whatman). Détacher le gel de la grande plaque en soulevant un des coins du grand papier Whatman.

- Déposer le grand Whatman sur les Whatman imbibés de TBE, gel vers le haut. Veiller à ce que la partie du gel contenant les échantillons soit en contact avec les Whatman mouillés.
- Placer la membrane de Nylon dans du TBE 0,5X cc et la déposer ensuite sur le gel au niveau des échantillons. Eviter absolument les bulles entre la membrane et le gel.
- Placer les 4 Whatman encore secs sur la membrane et recouvrir le tout de la grande plaque.
- Le transfert s'effectue par capillarité pendant 75 min.
- Déposer la membrane entre deux papiers Whatman secs.

4.- Fixation de l'ADN sur la membrane.

- Laisser sécher la membrane entre deux Whatman secs pendant au moins 30 minutes.
- Cuire la membrane à 80°C pendant 30 minutes.
- Passer la membrane aux UV pendant 4 minutes, ADN côté UV.
- Sceller la membrane dans un sachet plastique en ménageant une ouverture pour introduire les solutions de détection.

5.- Détection et autoradiographie.

La membrane est révélée pades bains successifs dans des solutions fournies par le Phototope 6K kit (BioLabs).
Note: entre chaque rinçage, veiller à éliminer toutes les bulles du sachet avant de le mettre sous agitation.
A la fin de tous les passages dans les différentes solutions, déposer la membrane dans un sachet transparent et l'installer dans une cassette d'autoradiographie pendant 25 minutes, afin d'obtenir un signal maximal.

Autoradiographie et révélation du film:
- Installer un film rayons X dans la cassette et attendre 25 minutes à température ambiante.
- Faire une première révélation au bout de ces 25 min: plonger le film 2 min dans le bain révélateur, faire un rinçage dans de l'eau, 2 min dans le bain fixateur et terminer par un rinçage dans de l'eau.
Note: si les bandes sont trop faibles, installer un nouveau film dans la cassette et faire une autoradiographie plus longue.

E) Comparaison de séquences.

La recherche de séquences homologues à une séquence cible a été menée dans une banque de séquences non redondantes (GenBank) grâce à l'algorithme BLAST (Basic Local Alignement Research Tool; Altschul et al., 1990), accessible on-line sur le serveur du NCBI (National Center for Biotechnology Information) à l'adresse http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Recipon/index.html.

Les alignements multiples de séquences ont été effectués grâce à l'algorithme ClustalW 1.5 accessible sur le serveur du Baylor College of Medicine (USA) à l'adresse:
http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html.

Bibliographie.

S. F. Altschul, F. Stephen, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990)
Basic local alignement search tool.
J. Mol. Biol. 215: 403-410.

G. A. Armstrong, B. Weisshaar and K. Hahlbrock (1992)
Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores.
Plant Cell. 4: 525-537.

S. M. Assmann (1995)
Cyclic AMP as a Second Messenger in Higher Plants.
Plant Physiol. 108: 885-889.

L. A. Berkowitz and M. Z. Gilman (1990)
Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 5258-5262.

B. Biermann, E. M. Johnson and L. J. Feldman (1990)
Characterization and distribution of a Maize cDNA Encoding a Peptide Similar to the Catalytic Region of Second Messenger Dependent Protein Kinases.
Plant Physiol. 94: 1609-1615.

K. D. Bjorn (1993)
Plant Phosphoinositides and Intracellular Signaling.
Plant Physiol. 102: 705-709.

M. Boshart, F. Weih, M. Nichols and G. Schütz (1991)
The tissu-specific extinguisher locus TSE1 encodes a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase.
Cell. 66: 849-859.

M. E. Bossen, R. E. Kendrick and W. J. Vredenberg (1990)
The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated, Ca2+-dependent swelling of etiolated wheat protoplasts.
Physiologia plantarum. 80: 55-62.

J. M. Brosnan and D. Sanders (1993)
Identification and Characterization of High-Affinity Biding Sites for Inositol Triphosphate in Red Beet.
The Plant Cell. 5: 931-940.

I. A. Carre and L. N. J. Edmunds (1992)
cAMP-dependent kinases in the algal flagellate Euglena gracilis.
J. Biol. Chem. 267: 2135-2137.

V. C. Carricarte, G. M. Bianchini, J. P. Muschietti, M. T. Tellez-inon, A. Perticari, N. Torres and M. M. Flawia (1988)
Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (Medicago sativa).
Biochem.J. 249: 807-811.

J. Chappell, K. Hahlbrock and T. Boller (1984)
Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase.
Planta. 161: 475-480.

E.-J. Choi, Z. Xia, E. C. Villacres and D. R. Storm (1993)
The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases.
Curr. Op. Cell Biol. 5: 269-273.

J. C. Chrivia, R. P. S. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy and R. H. Goodman (1993)
Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP.
Nature. 365: 855-859.

A. I. Constantinou, S. P. Squinto and R. A. Jungmann (1985)
The phosphoform of the regulatory subunit RII of cyclic AMP-dependent protein kinase possesses intrinsic topoisomerase activity.
Cell. 42: 429-437.

J. Darnell, H. Lodish and D. Baltimore (1989)
La cellule, biologie moléculaire.
E. Vigot. Paris. 1189.

S. de Pater, F. Katagiri, J. Kijne and N.-H. Chua (1994)
bZIP proteins bind to a palindromic sequence without an ACGT core located in a seed-specific element of the pea lectin promoter.
Plant J. 6: 133-140.

S. De Vries, H. Hoge and T. Bisseling (1988)
Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues.
Plant Molecular Biology Manual. B6: 1-13.

D. A. Dempsey and D. F. Klessig (1994)
Salicyclic acid active oxygen species and systemic acquired resistance in plants.
Trends in cell biology. 4: 334-338.

B. K. Drobak, P. A. C. Watkins, R. Valenta, S. K. Dove, C. W. Lloyd and C. J. Staiger (1994)
Inhibition of plant plasma membrane phosphoinositide phospholipase C by the actin-binding protein, profilin.
The Plant Journal. 6: 389-400.

K. Fairley-Grenot and S. M. Assmann (1991)
Evidence for G-Protein Regulation of Inward K+ Channel Current in Guard Cells of Fava Bean.
The Plant Cell. 1037-1044.

E. E. Farmer and C. A. Ryan (1992)
Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors.
The Plant Cell. 4: 129-134.

K. Ferreri, G. Gill and M. R. Montminy (1994)
The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 1210-1213.

C. J. Fiol, J. S. Williams, C. Chou, Q. M. Wang, P. J. Roach and O. M. Andrisani (1994)
A secondary phosphorylation of $CREB^{341}$ at Ser^{129} is required for the cAMP-mediated control of gene expression.
J. Biol. Chem. 269: 32187-32193.

N. S. Foulkes, E. Borrelli and P. Sassone-Corsi (1991)
CREM gene : use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription.
Cell. 64: 739-749.

L. Gangwani, B. K. Tamot, J. P. Khurana and S. C. Maheshwari (1991)
Identification of 3',5'-cyclic AMP in axenic cultures of Lemna Paucicostata by High-Performance Liquid Chromatography.
Biochemical and biophysical research communications. 178: 1113-1119.

G. A. Gonzalez and M. R. Montminy (1989)
Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133.
Cell. 59: 675-680.

G. A. Gonzalez, K. K. Yamamoto, W. H. Fischer, D. Karr, P. Menzel, W. Biggs III, W. W. Vale and M. R. Montminy (1989)
A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence.
Nature. 337: 749752.

M. J. Guiltinan, W. R. Marcotte and R. S. Quatrano (1990)
A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element.
Science. 250: 267-271.

M. Hagiwara, A. Alberts, P. Brindle, J. Meinkoth, J. Feramisco, T. Deng, M. Karin, S. Shenolikar and M. Montminy (1992)
Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB.
Cell. 70: 105-113.

T. Hai and T. Curran (1991)
Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 3720-3724.

N. Hayashida, M. T. and S. K. (1993)
Cloning and characterisation of a plant gene encoding a protein kinase.
Gene. 124: 251-255.

M. F. Hibert, J. Hoflack, t.-K. S. and B. A. (1993)
Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G.
m/s. 9: 31-40.

J. P. Hoeffler, T. E. Meyer, Y. Yun, J. L. Jameson and J. F. Habener (1988)
Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein : structure based on a cloned placental cDNA.
Science. 242: 1430-1433.

S. Ishiguro, M. Tanaka, A. Kojimoto, M. Kato, M. Iwabuchi and K. Nakamura (1993)
A nuclear factor that binds to a dyad-symmetric sequence with a CGTCA motif in the 5'-upstream region of the sweet potato β-amylase gene.
Plant Cell Physiol. 34: 567-576.

J.-Y. Kim and P. N. Devreotes (1994)
Random chimeragenesis of G-protein-coupled receptors.
J. Biol. Chem. 269: 28724-28731.

F. Kurosaki, Y. Tsurusawa and A. Nishi (1987)
Breakdown of Phosphatidylinositol during the Elicitation of Phytoalexin Production in Cultured Carrot Cells.
Plant Physiol. 85: 601-604.

E. Lalli and P. Sassone-Corsi (1994)
Signal transduction and gene regulation : the nuclear response to cAMP.
J. Biol. Chem. 269: 17659-17362.

P. Lamb and S. L. McKnight (1991)
Diversity and specificity in transcriptional regulation : the benefits of heterotypic dimerization.
TIBS. 16: 417-422.

W. H. Landschulz, P. F. Johnson and S. L. McKnight (1988)
The leucine zipper : a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins.
Science. 240: 1759-1764.

M. A. Lawton, R. T. Yamamoto, S. K. Hanks and C. J. Lamb (1989)
Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs.
Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3140-3144.

K. A. W. Lee (1991)
Transcriptional regulation by cAMP.
Curr. Op. Cell Biol. 3: 953-959.

L. Legendre, P. F. Heinstein and P. S. Low (1992)
Evidence for Participation of GTP-binding Proteins in Elicication of the Rapid Oxidative Burst in Cultured Soybean Cells.
The Journal of Biological Chemistry. 267: 20140-20147.

B. Lewin (1990)
Genes IV.
O. U. Press. Oxford. 857.

W. Li, S. Luan, S. L. Schreiber and S. M. Assmann (1994)
Cyclic AMP Stimulates K+ Channel Activity in Mesophyl Cells of Vicia faba L.
Plant Physiol. 106: 957-961.

M. M. Loriaux, R. G. Brennan and R. H. Goodman (1994)
Modulatory function of CREB-CREMα heterodimers depends upon CREMα phosphorylation.
J. Biol. Chem. 269: 28869-28843.

H. Ma, M. F. Yanofsky and E. M. Meyerowitz (1990)
Molecular cloning and characterisation of GPA1, a G protein alpha subunit gene from Arabidopsis thaliana.
Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 3821-3825.

M. C. Mehdy (1994)
Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens.
Plant Physiol. 105: 467-472.

Z.-H. Miao, X. Liu and E. Lam (1994)
TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Mol. Biol. 25: 1-11.

Z.-H. Miao and E. Lam (1995)
Construction of a *trans*-dominant inhibitor for members of the TGA family of transcription factors conserved in higher plants.
Plant J. 7: 887-896.

S. D. Michaels, M. C. John and R. Amasino (1994)
Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation.
Biotechniques. 17: 274-276.

C. A. Molina, N. S. Foulkes, E. Lalli and P. Sassone-Corsi (1993)
Inducibility and negative autoregulation of CREM : an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor.
Cell. 75: 875-886.

M. R. Montminy, K. A. Sevarino, J. A. Wagner, G. Mandel and R. H. Goodman (1986)
Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 6682-6686.

M. R. Montminy and L. M. Bilezikjian (1987)
Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene.
Nature. 328: 175-178.

M. R. Montminy, G. A. Gonzalez and K. K. Yamamoto (1990)
Regulation of cAMP-inducible genes by CREB.
TINS. 13: 184-188.

A. Nordheim (1994)
CREB takes CBP to tango.
Nature. 370: 177-178.

E. K. O'Shea, R. Rutkowski and P. S. Kim (1989)
Evidence that the leucine zipper is a coiled coil.
Science. 243: 538-542.

E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim and T. Alber (1991)
X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil.
Science. 254: 539-544.

K. Oeda, J. Salinas and N.-H. Chua (1991)
A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes.
EMBO J. 10: 1793-1802.

M. Ohme-Takagi and H. Shinshi (1995)
Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact With an Ethylene-Responsive Element.
The Plant Cell. 7: 173-182.

C. Pical, A. S. Sandelius, P.-M. Melin and M. Sommarin (1992)
Polyphosphoinositide Phospholipase C in Plasma Membranes of Wheat (Triticum aestivum L.).
Plant Physiol. 100: 1296-1303.

A. H. Price, A. Taylor, S. J. Ripley, A. Griffiths and A. J. Trewavas (1994)
Oxidative Signals in Tobacco Increase Cytosolic Calcium.
The Plant Cell. 6: 1301-1310.

P. G. Quinn (1993)
Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription.
J. Biol. Chem. 268: 16999-17009.

R.Gromes and K. Zetsche (1992)
Evidence for a G-protein Regulated Adenylate Cyclase and a Ca2+/Calmodulin Controlled Phosphodiesterase in the Phytoflagellate Chlorogonium.
Bot. Acta. 105: 395-399.

J. D. Rawn (1990)
Traité de biochimie.
d. B. Université. Bruxelles. 1146.

S. Reinbothe, B. Mollenhauer and C. Reinbothe (1994)
JIPs and RIPs : The Regulation of Plant Gene Expression by Jasmonates in Response to Environmental Cues and Pathogens.
The Plant Cell. 6: 1197-1209.

W. J. Roesler, G. R. Vandenbark and R. W. Hanson (1988)
Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription.
J. Biol. Chem. 263: 9063-9066.

M. Sheldon and D. Reinberg (1995)
Tuning-up transcription.
Curr. Biol. 5: 43-46.

M. Sheng, M. A. Thompson and M. E. Greenberg (1991)
CREB : A Ca^{2+}-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases.
Science. 252: 1427-1430.

M. I. Simon, M. P. Strathmann and N. Gautam (1991)
Diversity of G proteins in signal transduction.
Science. 252: 802-808.

A. Spiteri, O. M. Viratelle, P. Raymond, M. Rancillac, J. Labouesse and A. Pradet (1989)
Artefactual Origins of AMP in Higher.
Plant Physiol. 91: 624-628.

T. Tabata, T. Nakayama, K. Mikami and M. Iwabuchi (1991)
HBP-1a and HPB-1b : leucine zipper-type transcription factors of wheat.
EMBO J. 10: 1459-1467.

W.-J. Tang and A. G. Gilman (1991)
Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits.
Science. 254: 1500-1503.

T. Tezuka, S. Hiratsuka and S. Y. Takahashi (1993)
Promotion of the Growth of Self-Incompatible Pollen Tubes in Lily by cAMP.
Plant Cell Physiol. 34: 955-958.

J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994)
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignement trough sequence weighting, positions-specific gap penalities and weight matrix choice.
Nucleic Acids Research. 22: 4673-4680.

G. Tortora and Y. S. Cho-Chung (1990)
Type II regulatory subunit kinase restores cAMp-dependent transcription in a cAMP-unresponsive cell line.
J. Biol. Chem. 265: 18067-18070.

M. J. Varagona and N. V. Raikhel (1994)
The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions : DNA binding and nuclear localization.
Plant J. 5: 207-214.

S. D. Verhey and T. L. Lomax (1993)
Signal Transduction in Vascular Plants.
J Plant Growth Regul. 12: 179-195.

B. Vernooij, L. Friedrich, A. Morse, R. Reist, R. Kolditz-Jawhar, E. Ward, S. Uknes, H. Kessmann and J. Ryals (1994)
Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction.
The Plant Cell. 6: 959-965.

B. E. Wadzinski, W. H. Wheat, S. Jaspers, L. F. Peruski, R. L. Lickteig, G. L. Johnson and D. J. Klemm (1993)
Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation.
Mol. Cell
Biol. 13: 2822-2834.

K. M. Warpeha, H. E. Hamm, M. M. Rasenick and L. S. Kaufman (1991)
A blue-ligth-activated GTP-binding protein in the plasma membranes of etiolated peas.
Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8925-8929.