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 de protéines pariétales de Cichorium intybus par criblage immunologique d'une banque d'expression λ ZAP

DELESCAILLE, Marie-Céline

Award date:
2005

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: 07. Jul. 2025

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DE PROTÉINES PARIÉTALES DE *CICHORIUM INTYBUS* PAR CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE D'UNE BANQUE D'EXPRESSION λ ZAP

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Marie-Céline DELESCAILLLE

Juin 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Clonage et séquençage de protéines pariétales de *Cichorium intybus* par criblage immunologique d'une banque d'expression λ ZAP

DELESCAILLE Marie-Céline

Résumé

Une proportion non négligeable (> 3%) du génome des espèces végétales code pour des protéines liées aux hydrates de carbone. Ces protéines sont très variées et jouent un rôle dans la structure et dans le métabolisme de la paroi. Elles interviennent lors de différents processus cellulaires tels que la croissance, la réponse contre des pathogènes, la sénescence, et peuvent être utilisées dans certains procédés industriels. Peu de protéines pariétales ont été identifiées que ce soit chez les végétaux modèles et, à fortiori chez les astéracées, famille à laquelle appartient la chicorée industrielle.

L'objectif de ce mémoire est d'identifier des gènes codant pour des protéines pariétales. Parmi les différents outils d'investigation utilisables, nous avons choisi de développer un polysérum de souris contre des protéines pariétales de racines de chicorée et de cribler immunologiquement une banque d'expression.

La première partie de ce travail consiste en la caractérisation des protéines pariétales isolées par traitement salin de racines de chicorées, dont la détection d'activité estérase qui nous intéresse plus particulièrement. La seconde partie de ce travail concerne la mise au point des conditions de criblage de la banque et l'analyse d'un clone détecté. L'insert isolé est probablement un pseudogène, il possède de multiples codons stop dans les trois phases de lecture possibles. Dans sa phase de lecture +1, une séquence de 413 aa ininterrompue par de tels codons est observable, et on peut y identifier un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine kinase. Le pseudogène isolé montre une forte homologie avec des gènes codant pour des RLK-LRR (receptor like kinase ayant un domaine riche en leucine).

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2005

Promoteur : P. Van Cutsem

Remerciements

Mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur P. Van Custem pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir accepté d'être le directeur de ce mémoire.

Merci aux membres du jury d'avoir consacré un peu de leur temps à la lecture de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Françoise pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et ses précieux conseils qui ont fait progressé ce travail. Je remercie aussi les membres de l'URBV de m'avoir soutenue durant ces quelques mois, tout particulièrement Catherine et Pierre pour leurs conseils techniques avisés, ainsi que Françoise pour ses recommandations en informatique.

Ce travail n'aurait pas pu être possible sans mes parents qui m'ont toujours soutenue durant ces quatre années d'étude. Merci à mon papa pour ses corrections orthographiques, à ma maman et à ma sœur pour leur bonne humeur.

A mes amis et amies Lionel, Nath, Guillaume et tous les autres pour ces bons moments passés ensemble, merci. Je n'oublierai pas Benja, Aurélien et Cristina pour nos pauses syndicales, merci pour ces folies passagères qui amélioraient l'ambiance du laboratoire.

A tous ceux que je n'ai pas cité et qui ont participé de près ou de loin à ce mémoire je n'ai qu'un mot à dire : merci.

Abréviations

°C	degré Celsius
µl	microlitre
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AE	acétyle estérase
Ag	antigène
AGP	arabinogalactan protein
ARNm	acide ribonucléique messager
BCIP	bromochlorylindolophosphate
BET	bromure d'éthidium
BSA	sérum d'albumine bovine
C terminal	extrémité carboxy terminale
DO	densité optique
EDTA	éthylène diamine tétracétique
EST	expressed sequence tag
g	gramme
GIP	glycosyl phosphatidyl inositol
HG	homogalacturonane
HRP	horse radish peroxydase
IgG	immunoglobuline G
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LRR	leucine rich repeat
M	molaire
mA	milliampère
MCP	modified citrus pectin
MCS	site multiple de clonage
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
MLG	mixed linkage glucan
mm	millimètre
mM	millimolaire
N terminal	extrémité amino terminale
NBT	nitrobleu de tetrazolium
nm	nanomètre
PAE	pectine acétylestérase
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction
Pfu	plage forming unit
PG	polygalacturonase
PGA	acide polygalacturonique
PL	pectate lyase
PME	pectine méthylestérase
PRP	prolin rich protein
PVDF	polyvinyl difluoride

RE	réticulum endoplasmique
RGI	rhamnogalacturonane 1
RGII	rhamnogalacturonane 2
RLK	receptor like kinase
rpm	rotation par minute
RTK	receptor tyrosine kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser/Hyp	sérine/hydroxyproline
Taq polymérase	*Thermophilus aquaticus* polymérase
v/v	volume/volume
WAK	wall associated kinase
x	fois

Table des matières

1. INTRODUCTION

1.1 LA CHICOREE INDUSTRIELLE 1

1.1.1 CICHORIUM INTYBUS 1
1.1.2 INTERET INDUSTRIEL DE LA CHICOREE 1
1.1.2.1 L'inuline 2
1.1.2.2 Les pectines 2

1.2 LA PAROI CELLULAIRE ET LES PROTEINES PARIETALES 3

1.2.1 DEFINITION DE LA PAROI 3
1.2.2 LES POLYSACCHARIDES PARIETAUX 3
1.2.2.1 La cellulose 3
1.2.2.2 Les hémicelluloses 3
1.2.2.3 Les pectines 5
1.2.2.4 Evolution des modèles de la structure de la paroi 8
1.2.3 LES GLYCOPROTEINES 10
1.2.3.1 Les extensines (ou Hydroxyproline Rich Glycoprotein) 10
1.2.3.2 Les arabinogalactanes 10
1.2.3.3 PRP : proline rich protein 11
1.2.3.4 Hybrid PRP 11
1.2.3.5 Les expansines 11
1.2.3.6 Les protéines riches en glycine 11
1.2.4 LES ENZYMES DE DEGRADATION DE LA PAROI 12
1.2.4.1 Les enzymes hydrolytiques 12
1.2.4.2 Les transglycosylases dans la paroi végétale 15
1.2.4.3 Les oxydoréductases 15
1.2.4.4 Les lyases 16
1.2.5 LES PROTEINES AUX ZONES DE CONTACT ENTRE LA PAROI ET LA MEMBRANE PLASMIQUE 16
1.2.5.1 La cellulose synthase 16
1.2.5.2 Les AGP : arabinogalactan proteins 16
1.2.5.3 Les récepteurs transmembranaires 17

1.3 STRATEGIES D'ETUDE DES PROTEINES PARIETALES 19

1.3.1 L'APPROCHE PROTEOMIQUE 19
1.3.1.1 Isolement des protéines pariétales 19
1.3.1.2 La séparation des protéines 21
1.3.1.3 Identification des protéines 21
1.3.2 L'APPROCHE GENOMIQUE 21
1.3.2.1 Les EST : expressed sequence tag 22
1.3.2.2 Criblage d'une banque 22

1.4 OBJECTIFS DU MEMOIRE 25

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 EXTRACTION DES PROTEINES PARIETALES 26

2.2 CARACTERISATION DES EXTRAITS PROTEIQUES 28

2.2.1 DOSAGE BRADFORD 28
2.2.2 TEST D'ACTIVITE ESTERASE EN CUP PLATE 28
2.2.3 ELECTROPHORESE EN GEL NON DENATURANT 28

2.3 CARACTERISATION DU POLYSERUM 29

2.3.1 DOT BLOT 29
2.3.2 WESTERN BLOT 31
Electrophorèse en gel SDS-PAGE 31
Transfert 31

2.4 CRIBLAGE DE LA BANQUE 32

2.4.1 DESCRIPTION DE LA BANQUE 32
2.4.2 CRIBLAGE DE LA BANQUE 32

2.5 EXCISION D'UN CLONE POSITIF 34

Amplification du phage helper (ExAssist) 34
Titration du phage helper 34
Protocole d'excision d'un clone 36

2.6 PCR ET GEL D'AGAROSE 36

2.6.1 PCR 36
2.6.2 ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE 37
2.6.3 PURIFICATION DU PRODUIT PCR 37

2.7 SEQUENÇAGE D'ADN 37

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 EXTRACTION DES PROTEINES 38

3.2 CARACTERISATION DES EXTRAITS PROTEIQUES 38

3.2.1 TEST « CUP PLATE » 38
3.2.1.1 Avec comme substrat l'α-naphtyle acétate 38
3.2.1.2 Avec comme substrat le p-nitrophényle acétate 40
3.2.2 GELS SEMI-DENATURANT 40
3.2.3 ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES 42
3.2.4 CONCLUSION 42

3.3 CARACTERISATION DU SERUM 45

3.3.1 LA TECHNIQUE DU DOT BLOT 43
3.3.1.1 Seuil de détection du sérum et choix de sa dilution 45
3.3.1.2 Seuil de détection pour un sérum épuisé 47
3.3.1.3 L'épuisement est-il nécessaire ? 47
3.3.2 DETECTION EN WESTERN BLOT 47

3.4 CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'EXPRESSION 48

CONCLUSION 52

3.5 CARACTERISATION ET SEQUENÇAGE DU CLONE POSITIF ISSU DU CRIBLAGE 52

3.5.1 SEQUENÇAGE DU CLONE 52
3.5.1.1 Procédure d'excision du pBluescript 52
3.5.1.2 Séquençage du clone 53
3.5.2 CONCEPT DE PSEUDOGENE 55
3.5.2.1 Analyse de la séquence 55
3.5.2.2 Définition des pseudogènes 55
3.5.3 DETECTION D'UN PSEUDOGENE GRACE A UN POLYSERUM 56
3.5.3.1 La transcription des pseudogènes 56
3.5.3.2 La traduction du pseudogène 56
3.5.3.3 Détection grâce au polysérum 57
3.5.4 FONCTION POTENTIELLE DE GENES APPARENTES AU PSEUDOGENE 58
3.5.4.1 Analyse sur la séquence peptidique en phase +1 58
3.5.4.2 Recherche de gènes apparentés dans des banques EST 60

3.6 CONCLUSIONS 62

4. PERSPECTIVES

ISOLEMENT DE GENES CODANT POUR DES PROTEINES PARIETALES 64
ISOLEMENT DE RECEPTEURS PUTATIFS 65

5. BIBLIOGRAPHIE 45

Introduction

1.1 La chicorée industrielle

1.1.1 *Cichorium intybus*

La forme ancestrale de la chicorée est la chicorée sauvage (*Cichorum intybus* var. *sylvestre*), une espèce bisannuelle pouvant atteindre un mètre de hauteur (figure 1). Concernant le cadre systématique de cette plante :

Embranchement : Spermatophytes
Sous embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Ordre : Astérales
Famille : Astéracées
Sous famille : Lactucoideae ou Cichorioideae
Genre : Cichorium
Espèce : intybus L.

Il existe trois variétés de *Cichorium intybus*
sylvestre : sauvage
foliosum : « chicon » ou endive, barbe de capucin, chicorée rouge,…
sativum : industrielle

Figure 1 : représentation d'une inflorescence de *Cichorium intybus*.

C'est une plante allogame qui pousse dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie et d'Afrique. En Belgique, on la rencontre à l'état sauvage au bord des routes et dans les friches, surtout sur terrain calcaire (Lambinon *et al.*, 2004). Les égyptiens, les grecs et les romains connaissaient cette plante et la cultivaient comme plante médicinale aux vertus reconnues contre les maux d'estomac, de foie et contre les inflammations de la peau (Delaveau *et al.*, 1977). Ce n'est qu'aux environs du 17ème siècle que ses propriétés nutritives furent exploitées. Cultivée dans les jardins, elle a donné naissance à plusieurs variétés potagères consommées sous le nom de chicorée rouge, chicorée blonde, barbe de capucin, witloof ou chicon (appelé endive en France). Au 18ème siècle, lors du blocus continental, le prix du café augmenta de manière astronomique et la chicorée s'avéra être un bon succédané du café. Une fois bouillie et torréfiée, la racine remplace le café de manière satisfaisante. Jusqu'aux années 1980, les racines de chicorée ont été essentiellement utilisées pour la production de ce substitut du café.

	superficie (ha)		rendement (100kg/ha)		production (tonne)	
	2001	2004	2001	2004	2001	2004
chicorée à inuline	14.610	15.973	359,2	423,9	524.775	686.679
chicorée à café	646	293	352,1	423,8	22.745	12.417
betterave sucrière	95.553	88.377	587,5	668,9	5.613.923	5.911.535

Table 1 : statistiques agricoles concernant la surface cultivée, le rendement et la production suivis sur deux années pour la chicorée industrielle, la chicorée à café et la betterave sucrière.

1.1.2 Intérêt industriel de la chicorée

A l'heure actuelle, en Belgique, *Cichorium intybus* est cultivée pour la production d'inuline, un marché fort prometteur que se partagent deux entreprises sucrières : Warcoing S.A. et le groupe ORAFTI travaillant pour la Raffinerie Tirlemontoise. La chicorée industrielle est cultivée sur les terres riches, limoneuses et bien drainées. Entre 2001 et 2004, la production est passée de 524.775 tonnes à 686.679 tonnes, soit une augmentation de 30%.

1.1.2.1 L'inuline

L'inuline constitue la forme de stockage du carbone réduit chez la chicorée. C'est une fibre soluble, constituée d'une chaîne de fructoses liés en β 2→1 et terminée par un résidu glucose. Cette molécule possède différentes propriétés curatives, notamment des effets prébiotiques qui fourniraient un milieu favorable au développement de bactéries bénéfiques pour le système digestif. Ce sucre n'est pas utilisé par *Streptococcus mutans* pour former des acides et glucanes responsables par ailleurs des caries dentaires. L'inuline est aussi utilisée dans l'industrie alimentaire où elle remplace les graisses dans des produits tels que des desserts glacés,…

1.1.2.2 Les pectines

Cultivée pour sa production de sucres et de fibres d'inuline, la chicorée industrielle constitue une source actuellement inexploitée d'autres polysaccharides. Les pulpes de chicorée, sous-produits de l'extraction de l'inuline sont surtout destinées à l'alimentation animale et pourraient être valorisées comme source de pectines. Celles-ci sont utilisées comme agent gélifiant dans un grand nombre de produits alimentaires et pharmaceutiques,… Deux orientations d'études poursuivies par le laboratoire (URBV) concernent les pectines. La première se concentre sur les enzymes liées aux parois végétales et intervenant dans sa dégradation. Chez la chicorée, aucune enzyme de synthèse ou de dégradation de la pectine n'a été identifiée avec certitude, alors que chez *Arabidopsis thaliana* plus de 170 gènes semblent coder pour de telles enzymes (Henrissat et al., 2001). La seconde cherche à identifier les différents composants d'une voie de transduction du signal au départ d'un récepteur WAK (wall associated kinase) qui a pour ligand des fragments pectiques (Decreux et Messiaen, 2005).

1.2 La paroi cellulaire et les protéines pariétales

1.2.1 Définition de la paroi

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi extérieure à la membrane plasmique, paroi cellulaire qui détermine pour une grande part la forme de la cellule, la texture du tissu et la forme finale de l'organe. D'autres fonctions lui sont attribuées car elle contient différentes enzymes intervenant dans le transport, l'absorption et la sécrétion de substances ainsi que dans la défense contre les pathogènes (Raven *et al.*, 2000). Cette structure semi-rigide se compose de trois couches : la lamelle mitoyenne formée lors de la division cellulaire par le phragmoplaste qui est coincée entre les deux cellules filles, la paroi primaire et la paroi secondaire. Cette dernière ne se développe que lorsque la croissance cellulaire est terminée chez certains types cellulaires. La paroi primaire est composée de polysaccharides, de 2 à 10 % de glycoprotéines, de composés phénoliques (< 2 %), de minéraux (de 1 à 5%) et d'enzymes (O'Neil et York, 2003). Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse, les modifications et la dégradation de la paroi, plus de 2% du génome chez les végétaux codent pour ce type d'enzyme (Henrissat, 2001).

1.2.2 Les polysaccharides pariétaux

1.2.2.1 La cellulose

La cellulose constitue de 20 à 30% du poids sec de la paroi, ce qui en fait le polysaccharide majoritaire. Ce polymère est constitué de chaînes linéaires de β-1,4-D glucose. Celles-ci sont réunies pour former une microfibrille (figure 2). Ces microfibrilles s'enroulent pour former des macrofibrilles dont le diamètre est estimé à 0,5 µm (Raven *et al.*, 2000).

1.2.2.2 Les hémicelluloses

Ce groupe comprend les xyloglucanes, les xylanes, mannanes et arabinogalactanes. Les xyloglucanes sont les polysaccharides hémicellulosiques les plus abondants dans la paroi primaire des plantes ; excepté chez les graminées, les xyloglucanes peuvent constituer jusqu'à 20% du poids sec de la paroi. Ils sont composés d'un squelette de type cellulosique, une chaîne de glucoses liés en β-1,4 et branchés sur le carbone 6 par des résidus xylose, s'étendant parfois en chaîne latérale : xylose-galactose-fucose (figure 3A) (O'Neil et York, 2003).

Les xylanes sont des composants mineurs de la paroi primaire des dicotylédones et des monocotylédones non graminées mais sont abondants dans la paroi secondaire des espèces ligneuses et chez les graminées. Leur chaîne principale est constituée de résidus xylose liés en β1,4 qui peuvent être branchés en position 2 ou 3 par des résidus arabinoses, glucoses ou des chaînes latérales (O'Neil et York, 2003).

Parmi les hémicellulose contenant du mannose peuvent être distingués : le mannane, le galactomannane ou encore le glucomannane. Le mannane est un polymère composé d'un squelette de β-1,4 D mannose. Le galactomannane est abondant dans les graines de légumineuses et présente un squelette de mannoses liés en β 1,4 où sont greffés des chaînes ramifiées de galactoses (figure 3B). Le glucomannane est un polymère des parois secondaires

des espèces ligneuses, constitué d'un squelette où alternent les résidus glucose et mannose liés en β 1,4 (O'Neil et York, 2003).

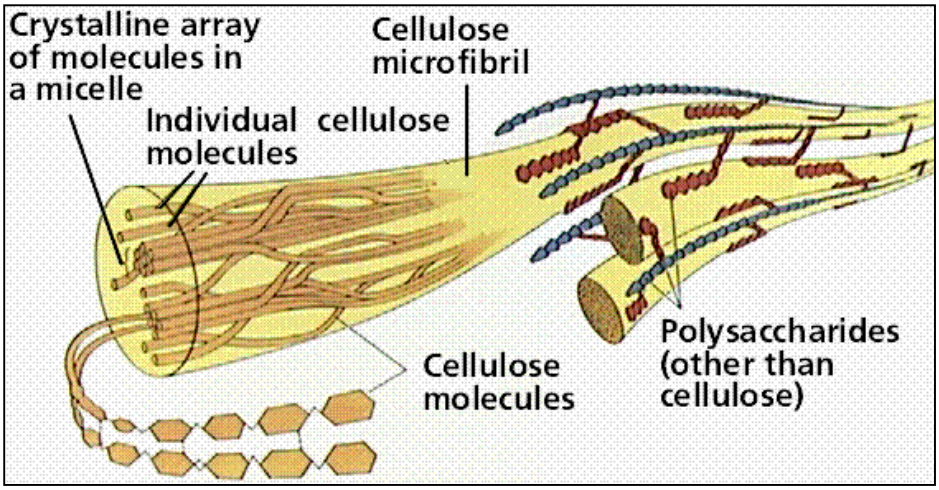


Figure 2 : représentation schématique de la structure des microfibrilles de cellulose et l'organisation des fibres dans la paroi végétale.

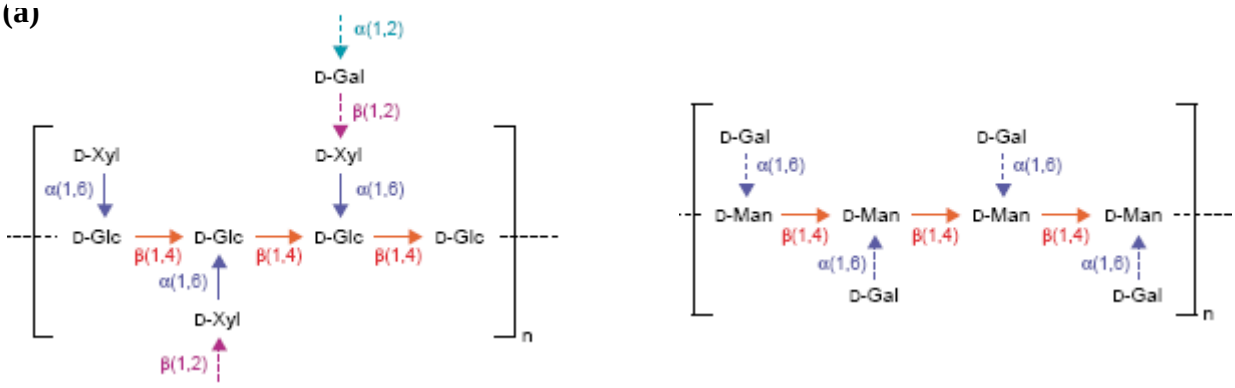


Figure 3 : (a) structure du xyloglucane (b) structure du galactomannane. Les flèches discontinues représentent des modes de substitution partielle, tandis que les flèches continues représentent les liaisons toujours présentent. Fuc : fucose ; G al : galactose ; Xyl : xylose (Reiter, 2002).

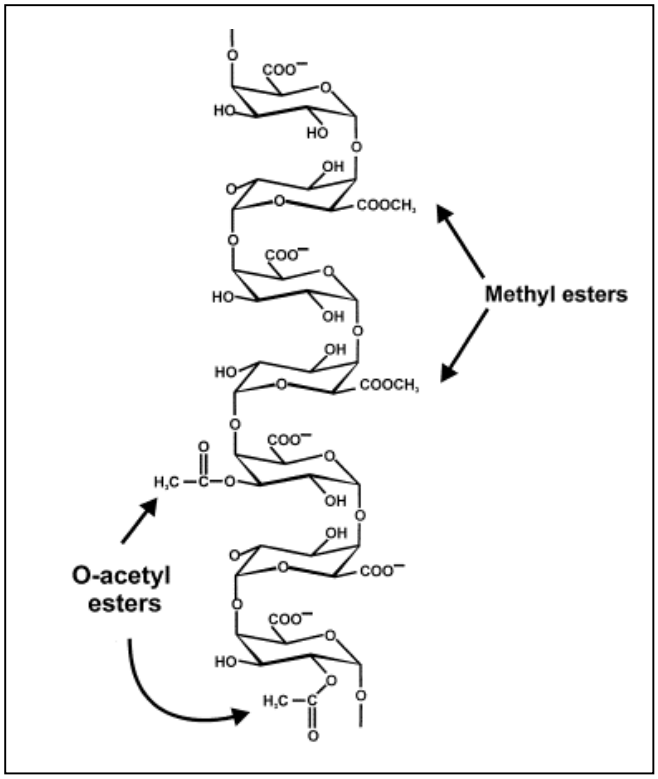


Figure 4 : structure primaire de l'homogalacturonane. Polymère linéaire de résidus d'acide D galacturonique lié en β 1→4, certains des carboxylates sont estérifiés avec du méthanol et sur les carbones 2 ou 3 il existe des acides acétiques (Ridley, 2000).

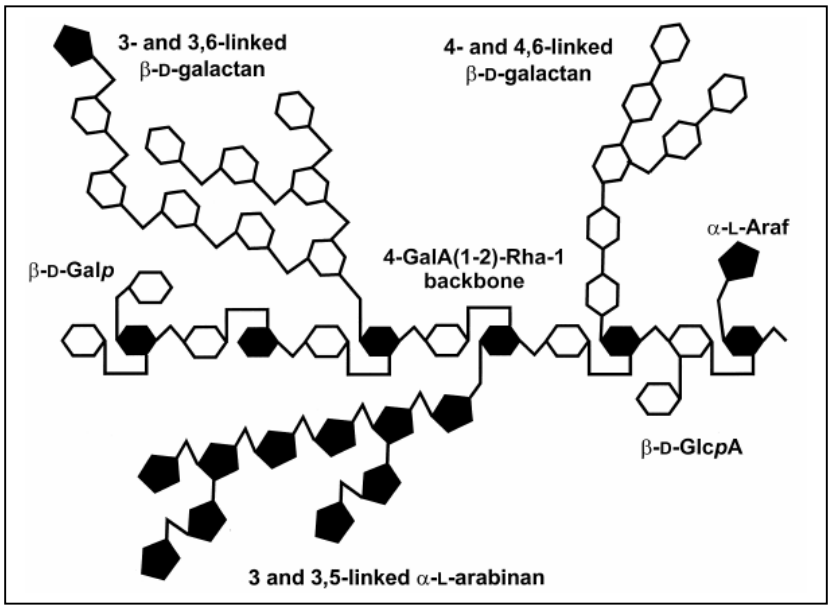


Figure 5 : modèle montrant les caractéristiques principales de RGI. La séquence est composée d'une répétition d'un disaccharide galactose – rhamnose et d'oligosaccharides linéaires ou ramifiés essentiellement composés d'arabinose ou de galactose attachés sur le carbone 4 de la chaîne linéaire (Ridley, 2000).

1.2.2.3 Les pectines

Les pectines constituent jusqu'à un tiers de toutes les macromolécules de la paroi primaire et sont également présentes dans la lamelle mitoyenne (Willats *et al.*, 2001). Trois polysaccharides pectiques majeurs existent dans toutes les parois primaires des cellules : l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II. Ils sont composés de 17 monosaccharides différents (Vincken *et al.*, 2003).

L'homogalacturonane (HG) est un homopolymère d'acide galacturonique lié en β 1,4 qui contient de 100 à 200 résidus (figure 4). Il est synthétisé dans l'appareil de Golgi et déposé dans la paroi sous forme partiellement estérifiée sur le carboxyle en position 6 et en partie acétylé sur les carbones 2 ou 3 (O'Neil et York, 2003).

Le rhamnogalacturonane I (RGI) a pour chaîne principale un disaccharide répété, le L rhamnose α (1→2), acide D galacturonique α (1→4). 20 à 80 % des résidus rhamnose sont substitués en C4 avec des chaînes latérales neutres ou des oligosaccharides acides (Willats *et al.*, 2001). Les chaînes latérales peuvent être de simples résidus (β-D-Gal) ou des polymères composés essentiellement d'arabinose et d'acide galacturonique qui peuvent être ramifiés ou non (figure 5)(O'Neil et York, 2003).

Le rhamnogalacturonane II (RGII) est structurellement différent du RGI : il est composé d'une chaîne principale de neuf acides galacturoniques liés en α-1,4 plutôt que de la répétition d'un disaccharide (Willats *et al.*, 2001). Quatre chaînes latérales de structure variée sont reliées à cette chaîne centrale (figure 6). Celles-ci contiennent 11 sucres différents, notamment de l'acide galacturonique et de l'arabinose mais aussi des sucres moins fréquents comme l'apiose, l'acide acérique, le KDO (2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid) (O'Neil et York, 2003). Suite à la liaison borate ester entre deux résidus apiose, le RGII existe sous forme de dimère. La formation de ces dimères résulte en la liaison de deux chaînes d'homogalacturonane (figure 7) sur lesquelles sont construites le RGII, ce qui contribue à la formation d'un réseau pectique tridimensionnel (O'Neil *et al.*, 2004).

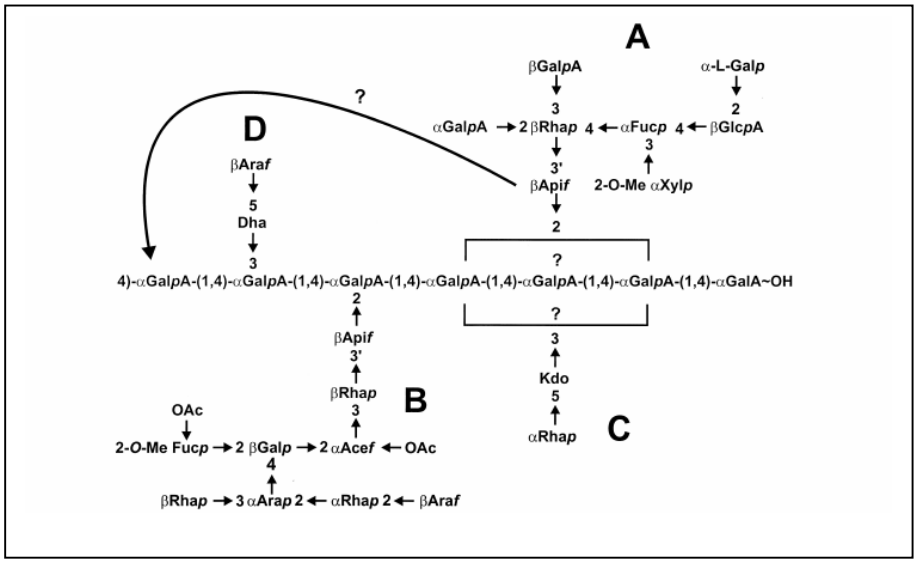


Figure 6 : structure primaire de RGII. Le squelette est composé d'au moins sept résidus d'acide galacturonique liés en α 1→4. Les quatre types de chaînes latérales sont représentés (A-D), l'ordre des chaînes n'a pas encore été déterminé de manière certaine (Ridley, 2000).

Modèle de la structure de la pectine

La structure fine des différents constituants de la pectine est assez bien caractérisée, mais peu d'informations sont disponibles sur la manière dont ces éléments s'assemblent en une macromolécule. Deux modèles sont proposés dans la littérature concernant la structure de la pectine. Dans le premier modèle, l'homogalacturonane et le rhamnogalacturonane I forment une chaîne continue considérée comme la « colonne vertébrale » de la pectine. L'HG non branché est appelé « région lisse », tandis que le RGI est appelé « région hérissée » au vu des nombreuses chaînes latérales qui y sont reliées (figure 8). Le second modèle proposé par Vincken *et al.* (en 2001) suggère que l'HG ne serait qu'une chaîne latérale du RGI (figure 9). Le RGI parcourrait parallèlement la plaque cellulaire des deux cellules filles et des chaînes d'HG y seraient attachées perpendiculairement. Ces dernières formeraient à plusieurs endroits un gel calcique suite à leur superposition avec les chaînes d'HG de la couche pectique suivante. Ce gel serait renforcé par les liaisons bore diester se formant entre deux RGII liés chacun à un HG différent. Ce modèle soulève d'autres questions quant à l'arrangement des chaînes latérales sur le squelette de RGI. Ces deux modèles se valent et il n'est pas possible à l'heure actuelle de trancher pour une hypothèse en particulier car la nature exacte du point d'attache entre l'HG et le RGI n'est pas déterminée.

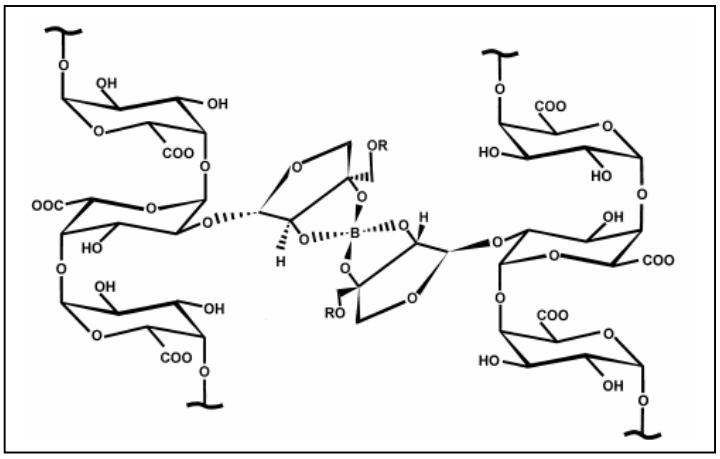


Figure 7 : pontage entre deux chaînes de RGII grâce à la liaison catalysée par une peroxydase impliquant un atome bore (Ridley, 2000).

Intérêt curatif des pectines : les pectines et le cancer

Les MCP (modified citrus pectin) sont des fragments obtenus au départ de pectines ayant subi un traitement chimique à haute température ; ces hydrates de carbone sont riches en galactose. Les résidus galactose montrent une affinité pour des cellules cancéreuses et semblent agir en diminuant les métastases dans certains types de cancer (mélanomes, cancer de la prostate et cancer du poumon). Les résidus galactose interagissent avec les galectines (notamment la galectine 3), ce qui permettrait de bloquer l'agrégation des cellules cancéreuses, leur adhésion et le développement de métastases. Les recherches sur les thérapies anti-métastatiques utilisant notamment les MCP sont très prometteuses mais elles ne concernent que des essais in vitro et chez les animaux et, à l'heure actuelle, peu d'études ont été menées chez l'être humain.

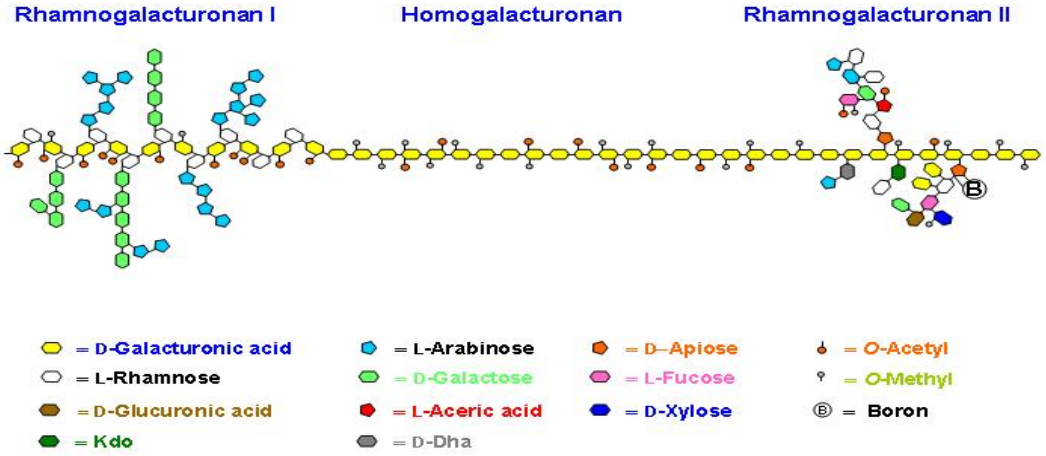


Figure 8 : Représentation schématique de la pectine : modèle classique.

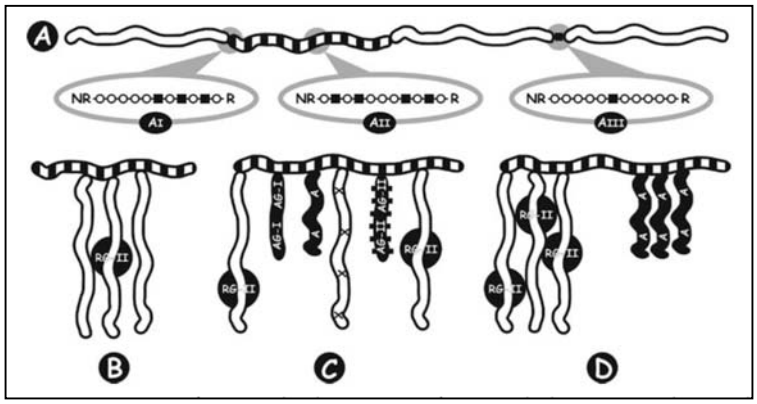


Figure 9 : représentation schématique de l'organisation des chaînes latérales sur une chaîne principale de RGI, selon le modèle de Vincken et al (Vincken, 2003).

1.2.2.4 Evolution des modèles de la structure de la paroi

Suite à la description des polysaccharides présents dans la paroi, il est possible de faire une ébauche du modèle de la paroi. En 1973, Keegstra *et al.* proposaient un modèle de la paroi où une matrice de polymères était constituée de xyloglucanes, de pectines et de protéines de structure tous liés de manière covalente. La cellulose y était reliée par des ponts hydrogène avec les xyloglucanes (figure 10A). En 1989, un nouveau modèle fut proposé par Fry et Hayashi. Ils suggèrent que les microfibrilles de cellulose sont attachées entre elles via de longues chaînes de xyloglucanes. Les protéines de structure et les polysaccharides pectiques formeraient un autre réseau indépendant empêtré dans celui de la cellulose et qui n'y serait pas relié de manière covalente (figure 10B). Ce modèle est probablement le plus populaire à l'heure actuelle mais d'autres variantes ont été proposées depuis, notamment le modèle « multicoat » de Talbott et Ray dans lequel les fibrilles de cellulose sont recouvertes avec des couches successives de plus en plus lâches d'une matrice de polysaccharides (figure 10C). Citons encore le modèle stratifié de Ha et al dans lequel des strates de pectine séparent des lamelles de cellulose-xyloglucane (figure 10D). Dans ces différentes constructions théoriques, la pectine n'est vue que comme un polysaccharide de remplissage. Peu de considérations sont

données au fait qu'elle contienne des microdomaines, d'où l'émergence du dernier modèle en date (Vincken *et al.*, 2003). Selon ces auteurs, la paroi consiste en une charpente de cellulose-xyloglucane qui est enchâssée dans une matrice de pectines interconnectées (figure 11). Ils étayent leur hypothèse en argumentant du fait que c'est la pectine et non les polymères de cellulose qui serait déposée en premier lors de la synthèse de la lamelle mitoyenne, ce que d'autres contestent. Après le dépôt d'une première couche de pectine, deux processus se dérouleraient en parallèle pour la formation de la paroi primaire et de la lamelle mitoyenne. Premièrement, la synthèse continue par l'appareil de Golgi des polymères tels que le xyloglucane et la pectine qui sont ajoutés à la première couche et, deuxièmement, la synthèse des microfibrilles de cellulose au niveau de la membrane qui sont excrétées dans la matrice extracellulaire où elles peuvent se lier aux xyloglucanes.

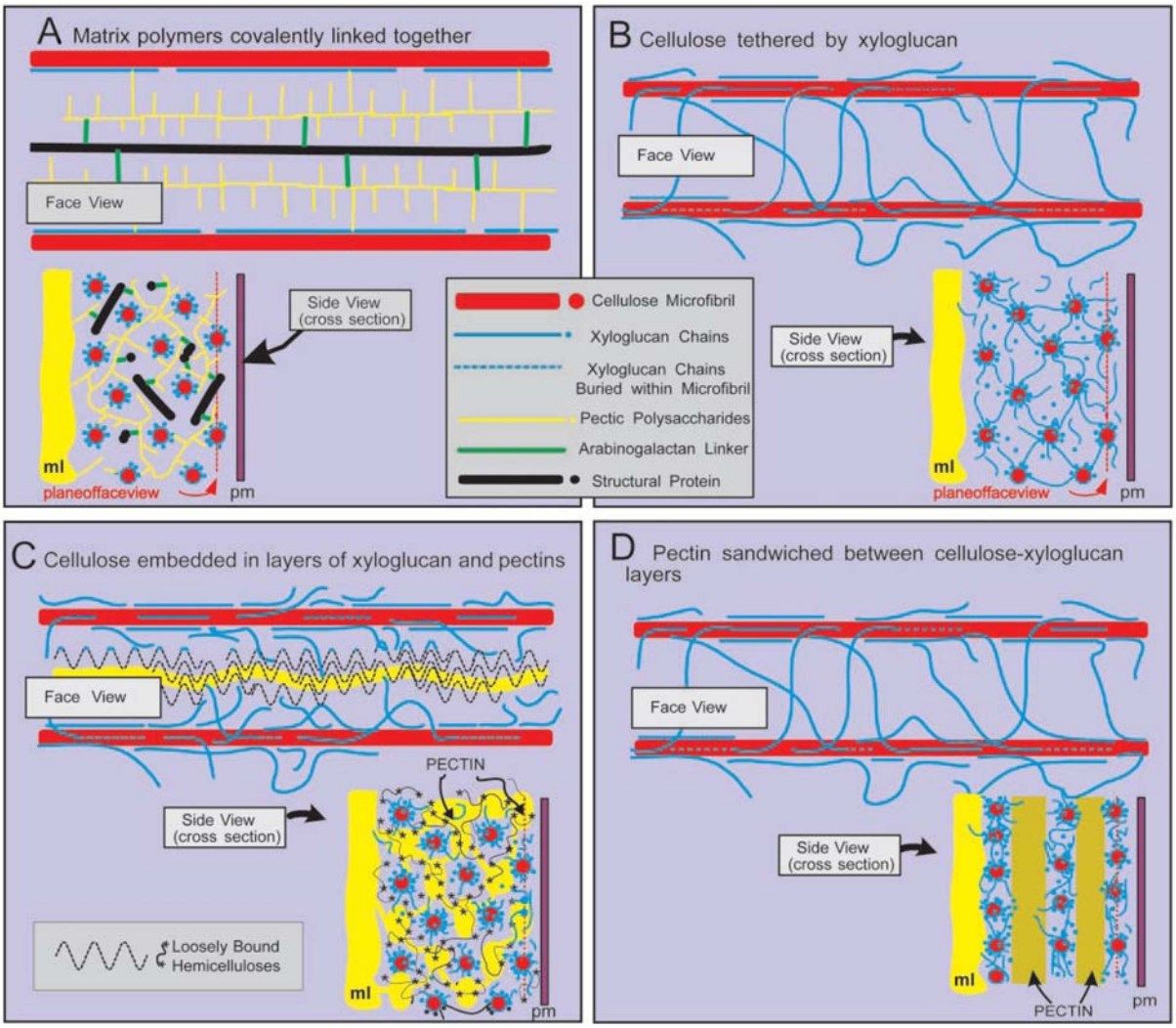


Figure 10 : modèle alternatif de structure de la paroi. A) le modèle de Keegstra et al dans lequel les polymères de la matrice sont connectés les uns aux autres par des liaisons covalentes. B) le modèle de Hayashi et Fry où des chaînes de xyloglucane emplissent les trous entre les microfibrilles et les relient les une aux autres. C) Modèle multicoat de Talbott et Ray dans lequel la cellulose est recouverte avec des couches successives de plus en plus lâches de polysaccharides de la matrice. D) le modèle stratifié de Ha et al, dans lequel des strates de polysaccharides pectiques séparent des lamelles de cellulose-xyloglucanes (Cosgrove, 2001).

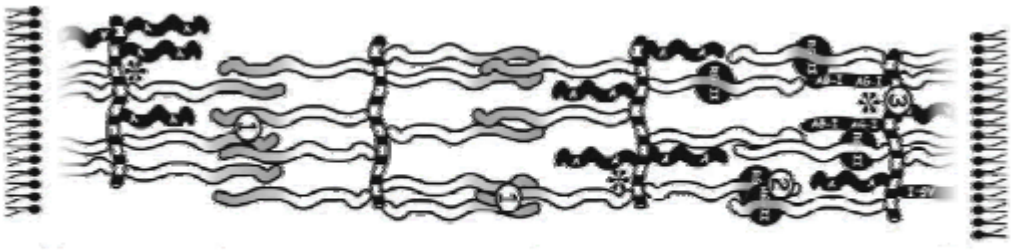


Figure 11 : modèle simplifié de la paroi selon Vincken. Vue latérale de deux parois primaires séparées par la lamelle mitoyenne (1), la charpente de cellulose-xyloglucane est enchâssée dans une matrice de pectine. Le RG2 (2) permet de faire des liaisons entre des couches successives de pectine grâce aux ions bores. Les chaînes principales de RGI sont pressées contre les microfibrilles de cellulose (astérisque). Les chaînes latérales d'un même RGI entourent les microfibrilles, ce qui les empêche de bouger (Vincken, 2003).

1.2.3 Les glycoprotéines

De manière assez grossière, il est possible de classer les protéines pariétales en deux catégories : les protéines de structure et les enzymes, les représentants de ces deux groupes pouvant être glycosylés. La N-glycosylation consiste en un lien N- glucosamine sur une asparagine impliquant une N-acétyle glucosamine. La O-glycosylation de la sérine avec du galactose et de l'hydroxyproline avec de l'arabinose nécessite un environnement Ser Hyp4 ; ce type de glycosylation est majoritaire sur les extensines et arabinogalactane protéines (AGP) (Estanyol *et al.*, 2000). Dans ce paragraphe, il sera question des glycoprotéines impliquées dans la structure de la paroi telles que les AGP et les extensines, mais aussi d'autres glycoprotéines comme les PRP, les HyPRP et les expansines.

1.2.3.1 Les extensines (ou Hydroxyproline Rich Glycoprotein)

Ces glycoprotéines ont une structure de base commune. Elles sont composées d'un peptide signal d'envoi vers la paroi et d'une région riche en proline avec un motif principal répété SerPro4 (Estanyol *et al.*, 2000). Elles sont exprimées dans la majorité des tissus de la plante, autant chez les plantes inférieures que supérieures (Showalter, 1993). L'expression des gènes est régulée lors du développement de la plante et est induite lors de blessure, en présence d'éliciteurs ou de pathogènes fongiques. Elles peuvent former des ponts isodityrosine entre elles ou avec d'autres molécules de la paroi. Cette réaction s'opère par l'intermédiaire d'une peroxydase et a pour conséquence son insolubilisation. Cette insolubilisation permet d'augmenter la rigidité de la paroi et de diminuer l'infection par d'éventuels pathogènes (Estanyol *et al.*, 2000).

1.2.3.2 Les arabinogalactanes protéines

Les arabinogalactanes sont des molécules constituées à 90% d'hydrates de carbone, essentiellement du galactose et de l'arabinose et, en moindre quantité, de rhamnose et d'acide glucuronique. Ces groupes de sucres sont liés aux résidus hydroxyproline, sérine, thréonine de la protéine centrale (Estanyol *et al.*, 2000). Ces glycoprotéines sont solubles et très

hétérogènes tant au point de vue de leur localisation que de leur structure (Showalter, 1993). Plusieurs fonctions leur sont attribuées grâce à leur capacité d'agrégation et d'adhérence, notamment lors de l'adhésion entre le pollen et le stigmate.

1.2.3.3 PRP : proline rich protein

Ces protéines possèdent un motif typique PPVYK répété fréquemment après un peptide signal. Elles n'ont pas de motif Ser/Pro4 comme les extensines et les AGP, ce qui pourrait être à l'origine de leur moindre glycosylation. Elles sont impliquées dans les stress oxydatifs déclenchés lors de blessures ou suite à la présence d'éliciteurs. Leur rapide insolubilisation augmente la rigidité de la paroi et permet d'éviter l'invasion par des pathogènes (Estanyol *et al.*, 2000).

1.2.3.4 Hybrid PRP

Ce sont des protéines multidomaines composées d'un peptide signal, d'un domaine riche en proline et d'un domaine C terminal non répétitif contenant des distributions spécifiques de cystéines permettant la classification de ces protéines en deux groupes (A et B). L'expression des gènes codant pour les Hybrid PRPs est spécifique à un stade du développement ou est le résultat d'une induction ou répression par un stress ou des hormones. Leur rôle n'est pas encore bien établi (Estanyol *et al.*, 2000).

1.2.3.5 Les expansines

Les expansines sont constituées d'un peptide signal hydrophobe, d'une région centrale avec 8 cystéines, d'une région basique et, au niveau du C terminal, de 4 tryptophanes conservés (Estanyol *et al.*, 2000). Ces glycoprotéines sont capables d'induire la croissance en condition acide. Elles causent l'expansion de la paroi par perte des associations non covalentes entre les polysaccharides pariétaux. Leur substrat est composé des complexes cellulose-hémicellulose dont elles rompent les ponts hydrogène (Brummell *et al.*, 2001).

1.2.3.6 Les protéines riches en glycine

Les glycine-rich proteins (GRP) peuvent être classées en deux catégories : celles ayant un peptide signal qui permet de les cibler vers la voie de sécrétion et celles ayant une séquence consensus de liaisons à l'ARN. Elles peuvent avoir différentes fonctions et localisations, leur seul point commun étant la présence de domaines riches en glycines (il existe trois types de répétitions : GGGX, GGXXXGG, GXGX). Différentes GRP ont été isolées de la paroi, où elles interviennent dans différents processus. Elles peuvent agir comme agent agglutinant pour le dépôt des constituants de la paroi. Elles peuvent s'associer entre elles ou avec d'autres constituants de la matrice extracellulaire via des ponts isodityrosines, ou encore agir comme ligand en se liant au domaine extracellulaire de kinases associées à la paroi. Au niveau du continuum paroi-membrane elles permettent de connecter la membrane avec la paroi ou la membrane avec le cytosquelette (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

1.2.4 Les enzymes de dégradation de la paroi

La paroi cellulaire végétale est le site d'une activité métabolique intense impliquant la présence d'enzymes. Une première classification grossière peut être réalisée parmi les enzymes de dégradation en fonction de leur activité. Il est possible de distinguer quatre classes : les enzymes hydrolytiques, les transglycosylases, les oxydoréductases et les lyases (Fry, 1995).

1.2.4.1 Les enzymes hydrolytiques

Les enzymes hydrolytiques peuvent être de plusieurs types en fonction des liaisons qu'elles clivent. Les plus fréquentes sont celles agissant sur les liens glycosidiques. Plus de 379 gènes codant pour ce type d'enzymes ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, ils peuvent être classés en 25 familles différentes en fonction de leur séquence (Henrissat, 2001). Les autres hydrolases agissent sur des esters carboxyliques ou des liaisons peptidiques.

Les exo-O-glycosylhydrolases

Ces enzymes, aussi connues sous le nom de glycosidases, sont les plus abondantes dans la paroi primaire (figure 12). Elles hydrolysent progressivement les polysaccharides par leur extrémité non réductrice, ce qui entraîne la libération de monosaccharides. En général, les glycosidases n'hydrolysent pas les liaisons glycosidiques d'un résidu sucré s'il est substitué avec un groupe acétyle ou méthyle ester (Fry, 1995).

Enzyme	Wall polymers that are possible substrates
Enzymes with high specificity for the aglycone of the substrate	
α-D-Xylosidase	xyloglucan
α-L-Fucosidase	xyloglucan, *N*-linked glycoproteins (?)
α-D-Galacturonidase	homogalacturonan (pectic acid)
Enzymes with low specificity for the aglycone of the substrate	
α-D-Mannopyranosidase	*N*-linked glycoproteins (e.g. peroxidase)
β-D-Mannopyranosidase	mannans[a]
α-L-Arabinofuranosidase	RG-I, xylans, extensins[b]
β-L-Arabinofuranosidase	extensins[c]
β-D-Xylopyranosidase	xylans[a], xylans[d]
α-D-Glucopyranosidase	none known
β-D-Glucopyranosidase	cellulose[a], xyloglucan[a], callose[a], MLG[a,e]
α-D-Galactopyranosidase	mannans, extensin
β-D-Galactopyranosidase	RG-I[e], xyloglucan
α-L-Rhamnosidase	RG-II[e]
β-D-Fructofuranosidase[f]	none known
α-D-Glucuronidase	xylans
β-D-Glucuronidase	none known
N-Acetyl-β-D-glucosaminidase	*N*-linked glycoproteins
N-Acetyl-β-D-galactosaminidase	*N*-linked glycoproteins
β-D-Cellobiosylhydrolase	cellulose[a]

Figure 12 : les exo-O-glycosylhydrolases de la paroi, et les polymères pariétaux qui sont leurs substrats potentiels (Fry, 1995).

Par exemple, les exopolygalacturonases sont des enzymes intervenant lors de la dégradation de la pectine. Elles clivent des unités simples d'acide galacturonique à l'extrémité non réductrice de polygalacturonanes si et seulement s'ils sont dé-estérifiés au préalable (Rose, 2003) (figure 13). Beaucoup de glycosidases hydrolysent la plupart des composés qui possèdent le résidu de sucre non modifié approprié à l'extrémité non réductrice et ce, quelle que soit la nature chimique de la liaison qui le lie au squelette carboné. Il existe trois exceptions à cet énoncé : les xylosidases, les fucosidases et les exo-polygalacturonases qui sont toutes trois des enzymes très spécifiques de leur substrat (Fry, 1995).

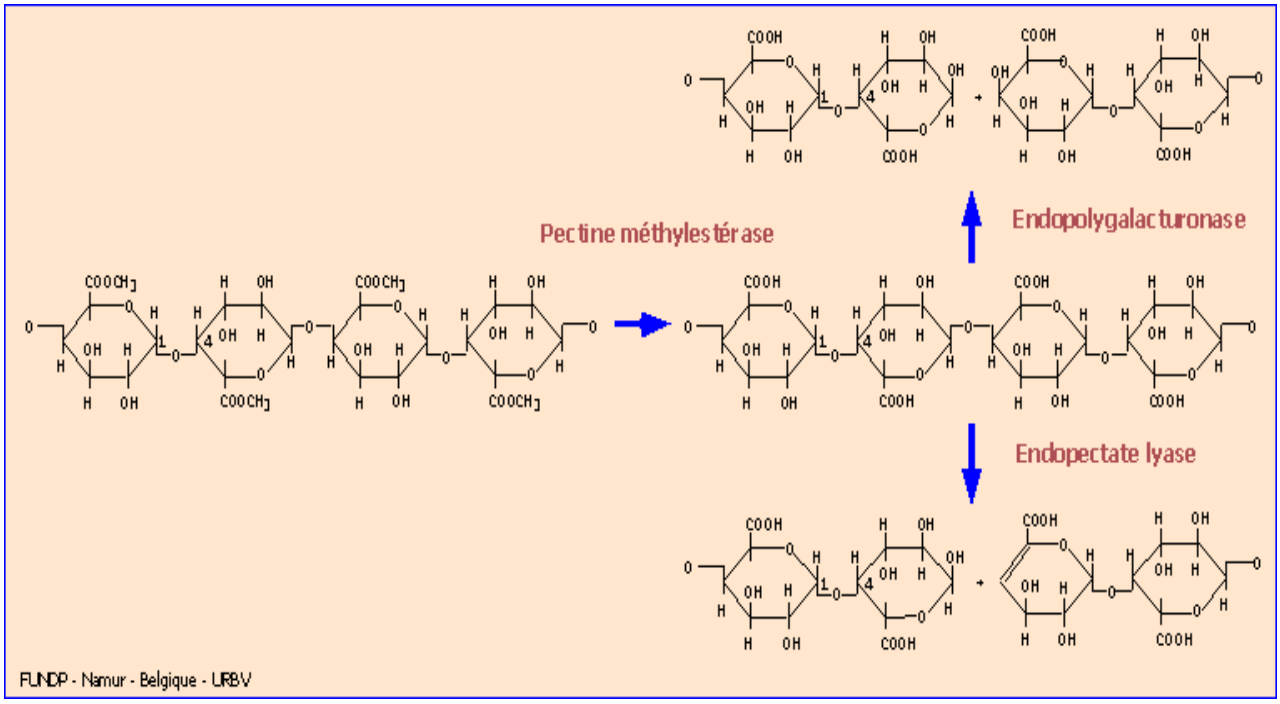


Figure 13 : enzymes intervenant lors de la dégradation de la pectine. Suite à leur dé-méthylation les chaînes d'homogalacturonanes sont rendues accessibles aux enzymes hydrolytiques et à certaines lyases.

Les endo-O-glycosylhydrolases

Ces enzymes sont aussi appelées endoglycanases. Elles hydrolysent les polysaccharides à n'importe quelle position, excepté aux extrémités. Elles ont un grand impact sur la longueur des polymères de sucres. Seules quatre enzymes agissant sur la paroi peuvent être classées dans cette catégorie : ce sont les endo-polygalacturonases (pectinases) qui agissent sur l'HG dé-estérifié, les mannanases, les xylanases et les cellulases. Ces dernières possèdent plusieurs substrats dont la cellulose, les xyloglucanes et les MLG (mixed linkage glucan) (Fry, 1995).

Les autres hydrolases

La paroi contient aussi des enzymes qui hydrolysent des groupements carboxy-ester, phosphate ester et des liaisons peptidiques.

Les « carbohydrate estérases »

Ce groupe d'hydrolases est constitué essentiellement de pectine estérases. Pour rappel, le squelette pectique est constitué d'une alternance d'HG et de RG qui possèdent des substituts

tels que des groupements méthyle et acétyle esters. La présence de ces groupes sur la chaîne peptidique peut influencer significativement les propriétés des pectines, notamment leur dégradation. Les pectine estérases sont capables d'hydrolyser ces méthyle et acétyle esters. Actuellement trois classes de ce type d'hydrolases ont été identifiées : les pectine méthylestérases, les pectine acétylestérases et les rhamnogalacturonane acétylestérases. Les pectine méthylestérases (PME) hydrolysent les méthyle esters qui sont présents sur la fonction carboxylique (C6) du squelette d'homogalacturonane. Les acétylestérases libèrent un groupe acétyle de la position O2 ou O3 d'un résidu d'acide galacturonique, les pectine acétylestérases (PAE) n'agissent que sur l'homogalacturonane tandis que les rhamnogalacturonane acétylestérases (RGAE) sont restreintes à une action sur le RG. Jusqu'à présent, seule l'action des PME et des PAE a été démontrée chez les plantes (Tucker and Seymour, 2002). Les féruloyl estérases sont un autre type d'estérases non identifiées chez les plantes et qui agissent au niveau de la paroi. Les acides féruloïques sont associés à différents constituants de la paroi, notamment aux chaînes latérales dans les régions hérissées de la pectine. Ils sont liés en C2 sur des résidus arabinofuranose ou en C6 sur des résidus galactopyranose des chaînes latérales. Leur distribution sur l'un ou l'autre type de résidus est équivalente. Les féruloyl estérases agissent sur la pectine et entraînent la libération d'un acide féruloïque aussi bien au départ d'un résidu arabinose que d'un résidu galactose (Kroon, 1996).

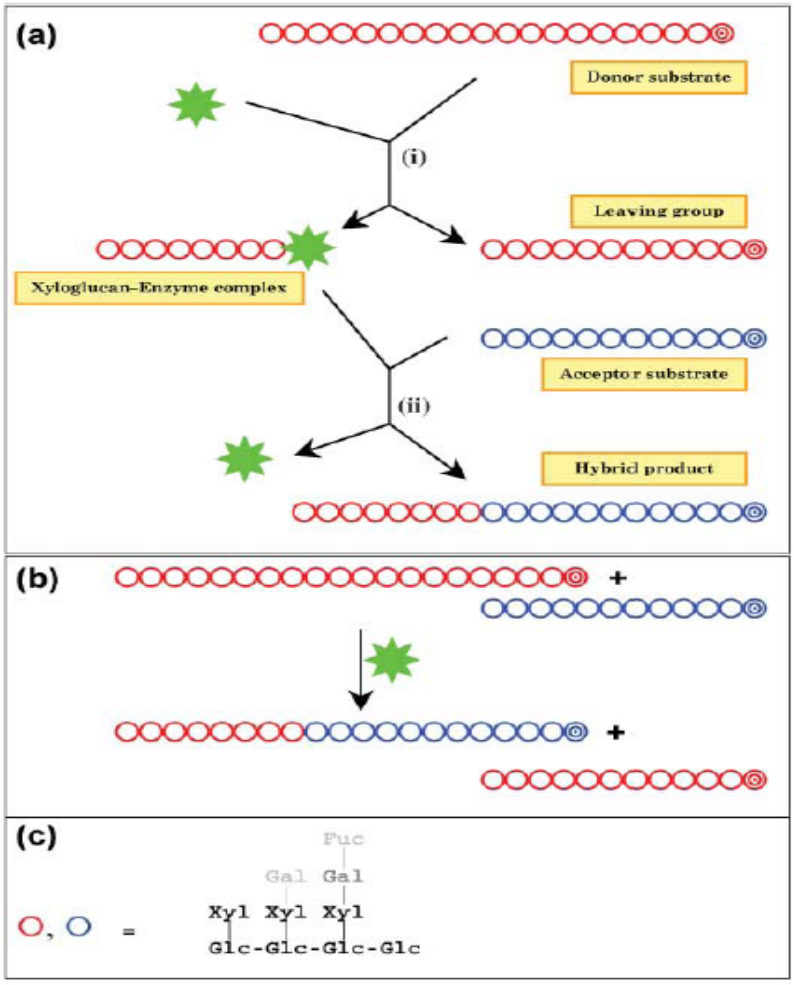


Figure 14 : vue schématique de la réaction d'endo-transglucosylation entre polysaccharides (xyloglucanes) catalysées par une endotransglucosylase/hydrolase (XHT). Chaque chaîne de ronds représente une molécule de xyloglucane, chaque cercle est une structure similaire à celle représenté en C. Il peut ne pas y avoir de différences au point de vue chimique entre les chaînes rouges et bleues. En A, la réaction est montrée en entier, la XTH (étoile) forme un complexe intermédiaire assez long « enzyme-xyloglucane » avant d'être relâchée (réaction ii) ainsi elle peut agir à un autre moment. Dans le schéma B, seule la réaction nette est montrée, la XTH est considérée plus ou moins considérée comme un catalyseur (Fry, 2004).

1.2.4.2 Les transglycosylases dans la paroi végétale

Les transglycosylases sont des enzymes clivant un lien glycosidique. Plutôt que de le transférer à l'eau, elles transfèrent le résidu vers un autre sucre. Il existe des endo-transglycosylases et des exo-transglycosylases qui ne transfèrent qu'un résidu vers un carbohydrate plus complexe (Fry, 1988). Une seule enzyme de type endo-transglycosylase a été identifiée dans la paroi des cellules végétales à l'heure actuelle. Il s'agit de la xyloglucane endotransglucosylase (XET) (figure 14). Cette enzyme clive et puis refait des liaisons glycosidiques dans le squelette de xyloglucanes. Désignées sous le terme plus général de XTH (xyloglucane endotransglucosylase hydrolase), ces enzymes sont impliquées dans l'expansion de la cellule en permettant le réarrangement des liaisons entre xyloglucanes existants et en facilitant l'incorporation dans la paroi de chaînes de xyloglucanes nouvellement synthétisées (Rose, 2003).

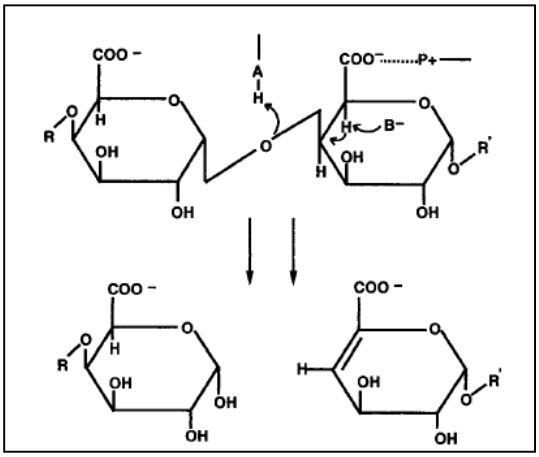


Figure 15 : résultat de la réaction enzymatique catalysée par une lyase. Suite à la rupture de la liaison entre deux acides galacturoniques, il y a formation d'une double liaison entre les carbone 4 et 5 (Herron, 2001).

1.2.4.3 Les oxydoréductases

Les peroxydases peuvent intervenir dans la dégradation de la paroi, bien que ce ne soit pas leur unique rôle. Les peroxydases sont divisées en deux classes chez les plantes. La classe I contient les peroxydases intra-cytoplasmiques et la classe III est composée de peroxydases sécrétées dans la paroi ou dans le milieu environnant. Les gènes codant pour ces enzymes font partie d'une famille multigénique (73 gènes chez *Arabidopsis thaliana*). Le fer central de la protoporphyrine et deux acides aminés (arginine et histidine distales) sont essentiels à son activité catalytique qui implique un échange d'électron et de proton (Passardi *et al.*, 2004). Les peroxydases catalysent la réduction de l'H_2O_2 en captant les électrons de donneurs variés tels que des composés phénoliques, des précurseurs de la lignine,… La diversité des substrats explique pourquoi ces protéines sont impliquées dans une large gamme de processus physiologiques tels que le catabolisme de l'auxine, la formation de la lignine et de la subérine, la défense contre les pathogènes, l'élongation cellulaire, … (Passardi *et al.*, 2004). Elles catalysent la formation de ponts diféruloyl entre les résidus pectiques et de ponts isodityrosine entre des molécules d'extensine (Andrews *et al.*, 2002). Leur action est associée à différents événements durant le développement végétal, depuis la germination jusqu'à la sénescence.

Les oxydases diffèrent des peroxydases en ce qu'elles utilisent l'O_2 plutôt que le H_2O_2 comme accepteur d'électron (Fry, 1988).

1.2.4.4 Les lyases

Deux lyases, la pectate lyase et la pectine lyase, agissent au niveau de la paroi végétale. Ces enzymes réalisent une réaction ayant un résultat plus ou moins similaire à celui des polygalacturonases. Dans ce cas, la liaison $\alpha(1\rightarrow4)$ entre acides galacturoniques est clivée non pas par une réaction hydrolytique mais par une réaction de β élimination. Celle-ci cause la formation d'une double liaison entre les C4 et C5 d'un acide galacturonique (figure 15). Ces enzymes peuvent avoir une activité de type exo- ou endo. Le squelette d'homogalacturonane de la pectine varie entre une forme méthylée relativement hydrophobe appelée pectine et une forme déméthylée et chargée connue sous le nom de pectate. Les formes méthylées et déméthylées de la pectine sont clivées respectivement par des pectine lyases ou des pectate lyases.

Des PL microbiennes ont été identifiées il y a plus de 40 ans ; leurs expression, rôles et activités ont été étudiés en détails depuis lors. Elles semblent impliquées dans la dégradation de la paroi lors de la pathogenèse. Par contre, peu d'exemples de PL chez les plantes ont été décrits. Il semble qu'elles soient associées à de nombreux événements lors du développement incluant la dégradation de la paroi, la pénétration du tube pollinique dans le style,… (Rose, 2003).

1.2.5 Les protéines aux zones de contact entre la paroi et la membrane plasmique

La paroi cellulaire est un arrangement complexe d'hydrates de carbone et de protéines dont la composition est difficile à étudier notamment à cause de leur solubilité limitée. Un certain nombre de protéines ont été identifiées comme faisant partie intégrante de la paroi, mais il existe différentes observations suggérant l'existence d'un continuum entre la paroi et la membrane plasmique, c'est-à-dire des protéines qui seraient associées à ces deux composants (He *et al.*, 1996). Différentes classes de protéines ont été mises en évidence à l'interface membrane-paroi. Il s'agit entre autres de certaines AGP, des WAK et de la cellulose synthase (Kohorn, 2000).

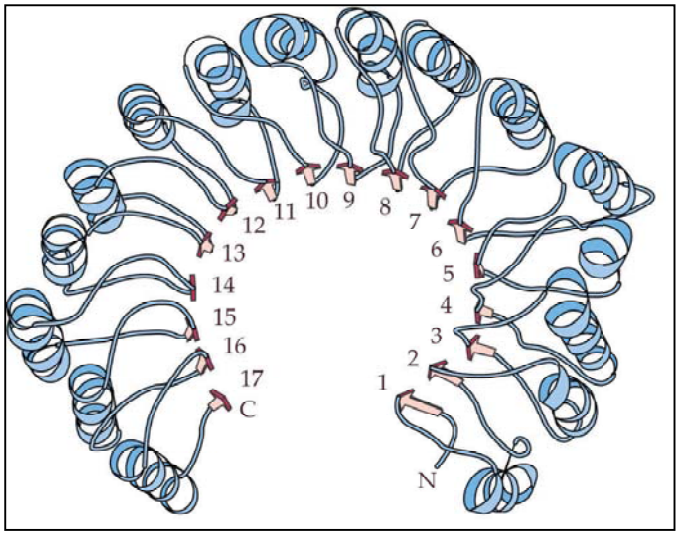
1.2.5.1 La cellulose synthase

La cellulose synthase est un des points de connexion entre la membrane plasmique et la paroi. Cette enzyme, impliquée dans la synthèse de la cellulose, forme une rosette constituée de multiples sous-unités de protéines et se trouve dans la membrane plasmique. Cette structure est associée à la sucrose synthase (SuSy) du côté cytoplasmique de la membrane. Cette association permet le transfert de glucose depuis le sucrose (via l'UDP-glucose) à une chaîne de cellulose en expansion. Quand le complexe enzymatique est couplé à la SuSy, il permet de relier le métabolisme cytoplasmique à l'établissement de l'architecture de la paroi (Kohorn, 2000).

1.2.5.2 Les AGP : arabinogalactan proteins

Les AGP sont des protéines constituées à 90% par des hydrates de carbone. La glycosylation de la chaîne protéique a lieu dans le système endomembranaire. Certaines AGP contiennent aussi un signal pour l'ajout d'un glycosyle phosphatidyle inositol (GPI) du côté carboxy-terminal de la protéine (Kohorn, 2000). Ce signal permet l'ancrage en membrane de l'AGP

plutôt que sa sécrétion dans la paroi. Les AGP co-purifient avec la fraction pariétale, lors du fractionnement de la cellule par centrifugation. Cette particularité peut s'expliquer par la structure des AGP qui leur permet d'établir de nombreuses liaisons avec des constituants pariétaux (Baluska, 2003).



1 Figure 16 : représentation schématique d'un domaine LRR, les sous unités sont constituées d'une hélice α et d'un feuillet β reliés par une boucle. Chacune est arrangée de telle façon que chaque feuillet β et chaque hélice α soient parallèles à un axe commun (Buchanan, 2000).

Les récepteurs transmembranaires ont leur partie extracellulaire qui peut être en contact avec la matrice extracellulaire, alors que leur domaine cytoplasmique est le point de départ d'une cascade de signalisation. L'exemple le mieux connu est celui des WAK (wall associated kinase).

Les récepteurs kinases chez les végétaux

Chez les animaux, la famille des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) est impliquée dans différents événements de signalisation au niveau de la surface cellulaire. Cette classe de récepteurs est définie par la présence d'un domaine extracellulaire pour la liaison du ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine tyrosine kinase cytoplasmique. Chez les plantes, les récepteurs like kinases (RLK) font partie d'un groupe de kinases ayant une structure de base similaire au RTK. Les RTK et les RLK font partie du groupe de protéines transmembranaires de type I. Celles-ci contiennent des protéines ne possédant qu'une hélice α transmembranaire. Chez Arabidopsis, plus de 300 RLK ont été identifiés et ils sont impliqués dans divers processus de signalisation (Shiu et Blecker, 2001). Ces récepteurs participent à la signalisation des brassinostéroïdes via BRI1, au contrôle du développement du méristème via CLV1, à la perception de la flagelline via FLS2,… Les RLK végétaux se distinguent malgré tout des RTK animaux car ils ont un domaine intracytoplasmique qui est une sérine/thréonine kinase et pas une tyrosine kinase. De même au niveau extracellulaire, leur domaine de liaison au ligand est différent. L'activité des RLK végétaux est essentiellement déduite de celle de RTK animaux étudiés *in vivo* (Torii, 2000). Suite à la liaison du ligand, il y a formation probable d'homo ou d'hétéro-dimères entre deux récepteurs. Leurs domaines cytoplasmiques se « phosphorylent » l'un l'autre, ce qui déclenche une cascade de signalisation et crée des

sites d'ancrage pour d'autres protéines. Une classification grossière des RLK végétaux peut être réalisée en tenant uniquement compte du type de domaine extracellulaire (Hardie, 1999).

Les WAK : wall associated kinase

Ces enzymes ont une structure type qui comprend un domaine intracytoplasmique sérine/thréonine kinase, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire assez étendu dans la paroi. La variabilité de ce dernier domaine permet de classer les WAK en cinq catégories (Kohorn, 2000). Tout comme les GPI anchored AGP, les WAK sont physiquement liées à la membrane plasmique et à la matrice d'hydrate de carbone, mais elles ont la particularité de pouvoir signaler un évènement extracellulaire via leur domaine kinase. WAK 1 fut la première enzyme de ce type découverte en 1996 par He et *al*., et est à l'heure actuelle le récepteur WAK le plus étudié et le mieux caractérisé. Le domaine extracellulaire de WAK 1 peut se lier à différents polysaccharides tels que le PGA, des oligogalacturonides, des pectines extraites d'*Arabidopsis thaliana* et des alginates ayant une structure proche de cette dernière (Decreux et Messiaen, 2005). WAK1 s'exprime dans tous les organes végétatifs et dans différentes plantes (*Arabidopsis thaliana*, la tomate, le maïs,…). L'étude de mutations affectant leur séquence a montré que le rôle des WAK est essentiel au développement de la plante et lors d'une attaque pathogène (Baluska, 2003).

Les LRR : leucine rich repeat

Ce type de domaine se retrouve dans différents types de protéines chez les eucaryotes et notamment comme domaine extracellulaire dans les RLK de plantes. Il est impliqué dans les interactions protéine-protéine. Les LRR ont comme sous-unité de structure une hélice α et un feuillet β connectés via une boucle (figure 16). Ces unités de structure sont arrangées de telle façon que chaque feuillet β et hélice α soient parallèles à un axe commun, ce qui résulte en une molécule non globulaire en forme de fer à cheval (Kobe *et al*., 2001). Tous les feuillets β sont alignés dans la circonférence interne de la molécule et les hélices α sont sur la circonférence externe. Les LRR ayant en plus un domaine kinase représentent le plus grand groupe de récepteurs kinase dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* avec 216 membres identifiés (Diévart *et al*., 2004). Elles représentent 13 sous familles (LRR I → XIII) qui sont classées en fonction de l'organisation de leur domaine LRR extracellulaire. Parmi les 216 LRR-RLK d'*Arabidopsis thaliana*, à peine une dizaine ont une fonction connue et seulement quelques-unes ont été étudiées de manière plus approfondie. Les domaines LRR régulent des processus développementaux variés mais agissent également au niveau de la perception des phytohormones ou encore dans les réponses de défense. Les régulateurs du développement sont entre autres ERECTA (gène spécifiant la forme des organes), CLAVATA1 qui participe au développement du méristème ou encore HAESA qui joue un rôle dans l'abscission florale. BRI1 (brassinosteroïd insensitive 1) est un récepteur putatif pour les brassinostéroïdes. D'autres gènes appartiennent à la famille des LRR-RLK tel que Xa21 qui est un gène de résistance aux maladies « race » spécifiques, ou encore les gènes codant pour la protéine FLS2 (flagellin sensing) qui est un récepteur putatif pour la flagelline (Torii, 2000).

Le S domain group

Ce domaine extracellulaire, relatif au locus S glycoprotéique (SLG) des espèces *brassica*, est impliqué dans la réponse d'auto-incompatibilité. L'auto-incompatibilité empêche les grains de pollen d'une plante de germer quand ils tombent sur le stigmate de la même plante. Elle est contrôlée par le locus S complex formé lui-même d'un groupe de gènes hautement polymorphes. Deux des gènes encodés par le locus S sont le SRK et le SLG qui sont tout deux

exprimés dans le stigmate. Ils y formeraient un récepteur pour certains composant du grain de pollen spécifié par le locus S. L'interaction positive entre les composants du pollen et les SLG/SRK causeraient une réponse qui empêcherait la germination du grain de pollen. Trois domaines S récepteur like kinase ont été isolés à l'heure actuelle chez *Arabidopsis thaliana* mais ils ne semblent pas être impliqués dans l'auto-incompatibilité car, premièrement ils ne sont pas exprimés au bon endroit et, deuxièmement *Arabidopsis thaliana* ne pratique pas l'auto-incompatibilité (Hardie, 1999).

Les lectin like domain group

Le motif lectine est homologue à la lectine présente chez les légumineuses. Il existe plusieurs récepteurs chez *Arabidopsis thaliana* qui présentent ce type de domaine. Comme, par exemple, les LCR et LRK1. La fonction biologique de ce domaine serait de fixer des oligosaccharides endo ou exogènes provenant de la dégradation de la paroi par un pathogène et d'initier la réponse de défense. Aucune fonction précise ne leur a encore été attribuée (Hardie, 1999).

1.3 Stratégies d'étude des protéines pariétales

Deux voies de recherche sont suivies en parallèle au laboratoire : l'une concerne les protéines pariétales interagissant avec les pectines ; l'autre s'intéresse plus particulièrement aux protéines intervenant dans les voies de transduction du signal. Il existe deux approches envisageables pour étudier ces protéines : soit une approche protéomique qui consiste à isoler puis à séparer et enfin à identifier les protéines, soit une approche génomique. Cette dernière se divise en deux axes : l'approche génomique structurelle et l'approche génomique fonctionnelle qui nous intéressera plus particulièrement dans le cadre de ce mémoire.

1.3.1 L'approche protéomique

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées par un génome. La protéomique quant à elle est l'étude des protéines à grande échelle. Ce type d'étude permet d'aborder des questions que l'analyse des séquences du transcriptome (l'ensemble des ARNm) ne permet pas d'appréhender, comme par exemple la localisation tissulaire, l'expression de la protéine, ses modifications post-traductionnelles,… (Zivy *et al.,* 2004). Les applications de la protéomique sont variées ; elles vont de l'identification « brute » de protéines, à la mise en évidence d'interactions entre protéines. Elle permet aussi la détermination de la structure globale de complexes (van Wijk J., 2001). Les analyses protéomiques sont généralement réalisées comme suit : les protéines sont extraites de tissus ou de cellules en suspension ; puis elles sont séparées par une électrophorèse bidimentionnelle d'où elles sont excisées pour être identifiées par spectrométrie de masse.

1.3.1.1 Isolement des protéines pariétales

Lors de l'isolement des protéines pariétales, il faut éviter les contaminations par des constituants intra- cytoplasmiques et prendre en compte la diversité des affinités des protéines pour les polysaccharides pariétaux. Deux méthodes permettent l'isolement de protéines

pariétales. Il s'agit de la méthode non disruptive, travaillant sur des cellules en suspension, et de la méthode disruptive permettant de travailler sur des tissus intacts. Ces deux types de matériel ont chacun leurs avantages et inconvénients. Les cellules en suspension, ne contiennent qu'une paroi primaire, leur croissance est reproductible et il est possible d'obtenir une grande quantité de biomasse (Slabas *et al.*,, 2004). Il est possible d'imiter dans leur milieu de culture les conditions d'élongation, d'embryogenèse ou d'attaque par un pathogène (grâce aux éliciteurs). Les tissus intacts quant à eux permettent l'étude de l'expression différentielle des protéines en fonction du temps et de leur localisation (Lee *et al.*, 2004).

Isolement des protéines pariétales par la méthode non disruptive

Cette approche fut mise au point par Robertson et collaborateurs en 1997. Les cellules en suspension vont subir différents lavages dans des solutions contenant des agents chélatants (ex : CDTA), des solutions de forte molarité,… Ces solvants permettant de rompre les interactions entre les protéines pariétales et la paroi tout en gardant la membrane plasmique intacte, évitant ainsi les contaminations cytoplasmiques.

Isolement des protéines pariétales par l'approche disruptive

C'est ce type d'approche qui a été retenu pour isoler les protéines pariétales lors de ce mémoire. Cette technique consiste en l'homogénéisation de tissus dans un tampon contenant une faible concentration en sels, suivie par des lavages séquentiels du culot des cellules dans ce même tampon pour éliminer les protéines cytoplasmiques contaminantes. Ensuite, le culot est lavé avec une solution de haute salinité pour libérer les protéines liées de manière ionique à la paroi.

Différentes sources de contamination sont envisageables, sachant que les pectines de la paroi agissent comme une matrice polyanionique. Des protéines chargées positivement venant de l'intérieur du protoplaste peuvent ainsi se lier à la paroi une fois que la membrane plasmique est rompue. Diverses précautions doivent donc être prises avant de classer les protéines isolées de cette manière dans la catégorie des protéines pariétales (Lee *et al.*, 2004), et d'autres approches sont à envisager pour vérifier leur localisation sub-cellulaire.

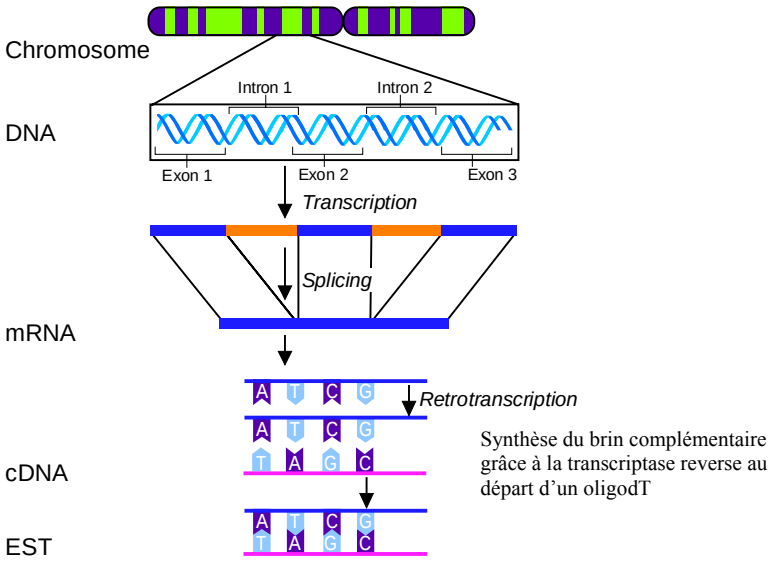


Figure 17 : les EST (expressed sequence tag) sont des fragments de séquences dérivés d'un groupe aléatoire de produit de transcription inverse d'ARNm, ce sont des ADNc. Ceux-ci sont polymérisés au départ d'un oligodT grâce à la reverse transcriptase. Une fois l'ARN convertit en ADN, les fragments double brin sont clonés dans un plasmide.

1.3.1.2 La séparation des protéines

L'électrophorèse bidimensionnelle consiste en deux électrophorèses consécutives, la première séparant les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique, la deuxième les séparant selon leur masse moléculaire. L'iso-électro-focalisation est réalisée dans des gels d'acrylamide en tubes capillaires ou en bandelette. Les polypeptides soumis à un champ électrique dans un gradient de pH migrent jusqu'à la position où leur charge est neutre, c'est-à-dire la position où le pH est égal à leur point isoélectrique. Après la migration, ce gel est déposé sur un gel SDS PAGE, où les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire (Zivy *et al.,* 2004).

1.3.1.3 Identification des protéines

Après révélation sur le gel (à l'argent ou avec du bleu de Coomassie), les protéines sont excisées en vue de leur identification ou bien le gel est scanné et des logiciels sont utilisés pour détecter et quantifier les spots ou pour comparer deux gels entre eux. Au cours des années 1990, différentes techniques ont été mises au point pour identifier les protéines séparées sur gel. Une première technique est le micro-séquençage par la méthode d'Edman.

La dégradation d'Edman permet d'analyser la séquence protéique à partir de l'extrémité N-terminale. Elle ne peut être appliquée que pour des protéines qui peuvent être isolées en grande quantité et dont l'extrémité N terminale n'est pas bloquée (Slabas *et al.*, 2004).

Actuellement, d'autres techniques permettant une analyse à plus haut débit sont utilisées telles que le peptide mapping (aussi appelé le peptide mass fingerprinting). Suite à l'excision d'une protéine sur gel d'électrophorèse à deux dimensions, la protéine est digérée par une protéase à des sites spécifiques (exemple : digestion à la trypsine) ce qui donne un groupe de peptides. La masse de ces peptides est mesurée par MALDI-TOF. Ces masses prédites sont comparées avec une liste de masses peptidiques mesurées en faisant une digestion théorique dans les banques de données nucléotidiques ou peptidiques. La protéine correcte est celle qui a le plus grand nombre de masses peptidiques qui correspondent entre l'empreinte expérimentale et l'empreinte théorique. Dans le cas où une protéine ne peut être identifiée sans ambiguïté par MALDI-TOF, la masse des séquences peptidiques est obtenue par ESI-MS-MS. Cette technique a comme avantage de pouvoir fournir la séquence peptidique en plus de la masse peptidique du fragment (van Wijk J., 2001).

1.3.2 L'approche génomique

La génomique vise à dresser un inventaire de l'ensemble des gènes d'un organisme (son génome), puis à étudier la fonction de ces gènes et leurs interactions.

Différentes méthodes d'analyse structurelle du génome existent (Delseny, Echeverria, Lasserre, 2004). Elles se classent en deux grandes catégories :

- l'analyse de la structure physique visant à décrire l'organisation de l'ADN en termes de distances physiques, de succession de séquences,…
- l'analyse de la structure génétique visant à comprendre comment les gènes sont distribués le long des chromosomes, comment ils ségrégent et se recombinent à

chaque génération. Cette analyse conduit à l'établissement de cartes génétiques de chromosomes.

La génomique fonctionnelle quant à elle regroupe l'ensemble des approches permettant de préciser la fonction des gènes. Cette approche comprend plusieurs orientations possibles, notamment le criblage immunologique d'une banque d'expression, ou encore l'identification de peptides signaux d'adressage. L'obtention de banques d'ADNc à partir de divers tissus suivi de leur séquençage partiel pour l'obtention d'étiquettes (EST) a joué un rôle majeur dans les programmes de génomique de différents organismes.

1.3.2.1 Les EST : expressed sequence tag

Une des approches permettant d'identifier un gène est d'établir qu'un fragment du génome est transcrit. Les EST (expressed sequence tag) sont des fragments de séquences dérivés d'un groupe aléatoire de produits de transcription inverse d'ARNm, appelés ADNc. Une banque d'ADNc est généralement construite au départ d'un tissu à l'aide d'un oligo-dT (figure 17) qui sert d'amorce de synthèse en s'associant à la queue polyA, mais il est possible d'initier la synthèse à partir de séquences internes en se servant d'hexamères aléatoires comme amorces. Une fois l'ARN converti en ADN, les fragments double-brin sont clonés dans un plasmide. Le séquençage de clones au hasard entraîne un taux de redondance qui est fonction de l'abondance des transcrits avant la transcription réverse. Malgré tout, ce type d'approche permet d'identifier de nouvelles séquences exprimées. Une importante proportion de gènes a une expression temporelle ou spatiale différentielle, qui peut être influencée par les conditions du milieu. Une grande variété de tissus est donc nécessaire pour pouvoir identifier un maximum de gènes possibles. Il est possible grâce au regroupement des EST en contig et à la connaissance de leurs tissus d'origine, d'avoir une première estimation des conditions d'expression du gène (Gibson and Muse, 2004).

1.3.2.2 Criblage d'une banque

Le criblage d'une banque génomique ou d'ADNc consiste à sélectionner spécifiquement des clones bactériens contenant la séquence du gène recherché. Deux types de criblage existent : le criblage par sondes nucléotidiques et le criblage immunologique. Ce dernier permet de cribler une banque sans connaissance préalable de la séquence nucléotidique ou protéique d'intérêt. Il a de plus l'avantage de relier le phénotype (la protéine exprimée) au génotype (séquence du clone isolé). Cette technique sera envisagée lors de ce mémoire en espérant pouvoir une séquence de protéines pariétales de chicorée.

Le criblage immunologique d'une banque d'expression

Quand aucune connaissance n'est disponible sur la séquence protéique ou nucléotidique du gène à cloner, le criblage immunologique d'une banque peut être envisagé. Une approche biochimique peut aboutir à la purification d'une protéine et à l'obtention d'anticorps dirigés contre celle-ci. Dans le cadre de ce mémoire, des protéines pariétales de racines de chicorée ont été inoculées à une souris. Le sérum produit a servi à cribler une banque d'expression λ ZAP afin d'isoler des clones codant pour ce type de protéines.

Le criblage d'une banque se déroule en trois étapes : l'infection, l'empreinte et la révélation qui dans ce cas est un marquage immunologique. Le protocole utilisé lors de cette étude sera décrit avec plus de précision dans la partie « matériel et méthode ». De manière générale, sur

une boîte de Pétri, les phages sont multipliés sur un tapis bactérien de manière à obtenir des plages de lyse individuelles et bien séparées (= étape d'infection). Une réplique de la boîte de culture est réalisée à l'aide d'une membrane de nitrocellulose (= empreinte), cette dernière permettant d'immobiliser l'antigène sur un support solide. L'étape de révélation est basée sur la reconnaissance de cet antigène par un anticorps dirigé contre lui. Ensuite le complexe Ac-Ag et lui-même reconnu par un anticorps secondaire permettant la détection en fluorescence, en chémiluminescence ou en colorimétrie (figure 18).

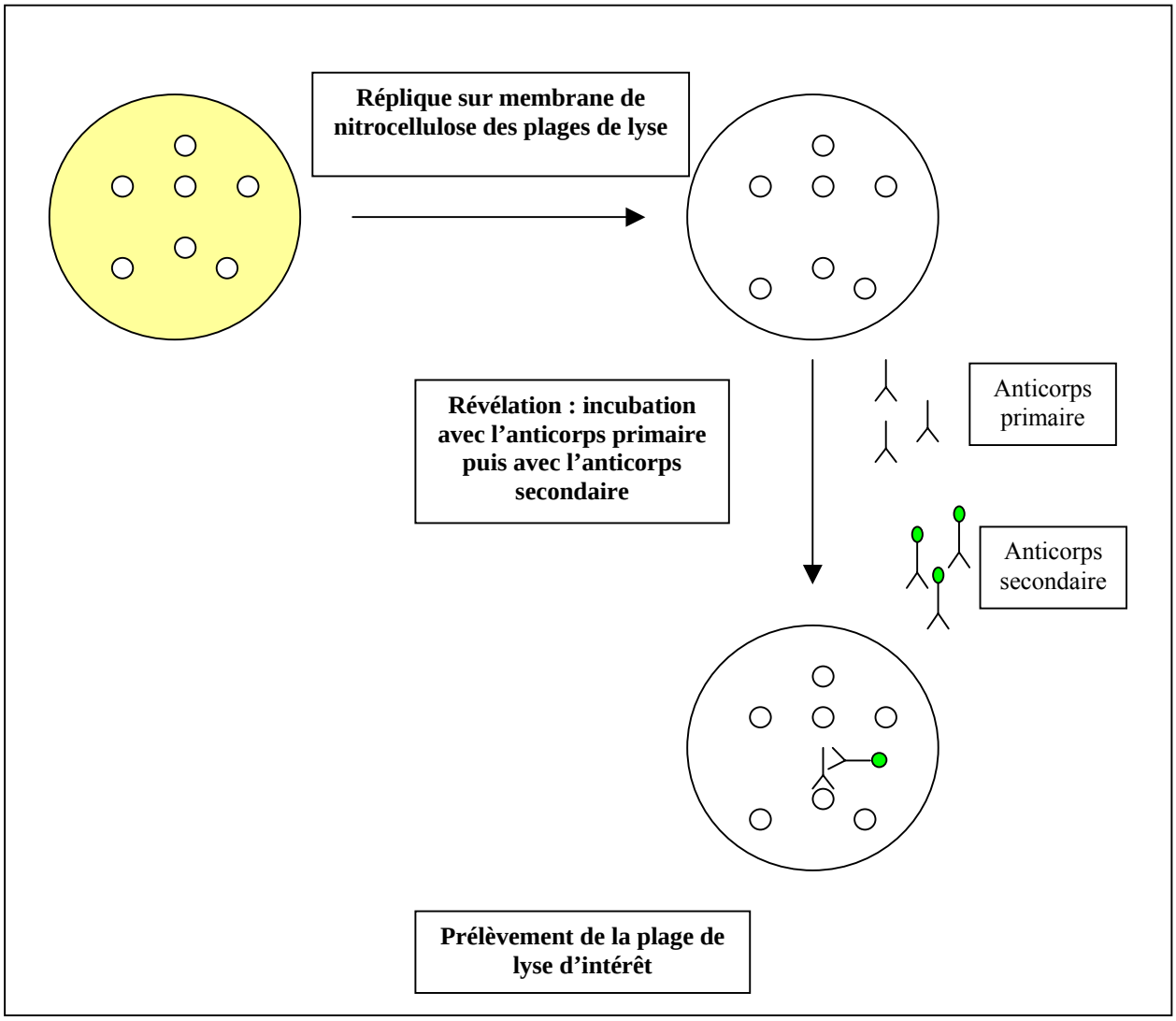


Figure 18 : schéma du marquage immunologique. Premièrement une réplique des plages de lyse est réalisée sur membrane de nitrocellulose. Celle-ci subit différentes incubations, elle est d'abord saturée avec de la poudre de lait ou de la BSA, ensuite elle est incubée avec une solution d'anticorps primaires puis avec une solution d'anticorps secondaire. Les anticorps permettant la détection en étant couplés soit avec une sonde fluorescente, soit avec la HRP ou la phosphatase alcaline qui en présence de leur substrat donne un produit coloré.

Criblage de séquence nucléotidique

Si la séquence de la protéine dont on veut isoler le gène est connue, il est possible de concevoir une séquence nucléotidique correspondante en suivant les règles du code génétique. Du fait de la dégénérescence du code, plusieurs séquences nucléotidiques sont obtenues. Le mélange de séquences est synthétisé et marqué radioactivement.

Les sondes nucléotidiques sont utilisées dans de multiples techniques : lors de Southern blot, de Northern blot, elles permettent aussi de faire de l'hybridation *in situ* directement sur le chromosome ou encore de cribler des banques d'ADN. Lors du criblage d'une banque l'hybridation se fait *in situ,* une réplique des clones bactériens cultivés sur boite de Pétri est réalisée sur membrane de nitrocellulose. Les bactéries « accrochées » à la membrane subissent différents traitements visant à les lyser et, en même temps, à dénaturer l'ADN. Les molécules simple brin correspondantes se trouvent immobilisées à l'emplacement de chaque clone. Après l'étape d'hybridation avec les sondes, les clones positifs seront marqués (figure 19).

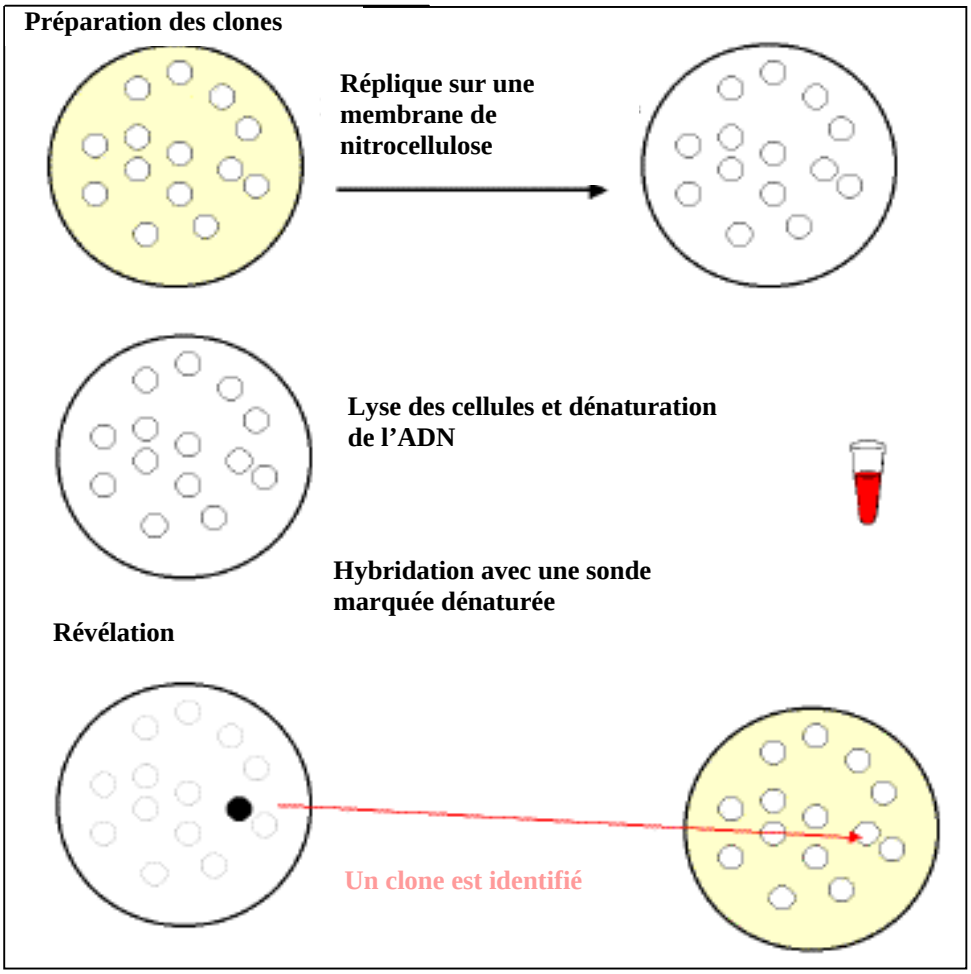


Figure 19 : criblage par hybridation de l'ADN des clones transformés avec une sonde spécifique. L'hybridation peut se faire in situ, suite à des répliques des clones bactériens sur des membranes de nitrocelluloses et à leur révélation.

1.4 Objectifs du mémoire

Comme nous l'avons montré dans l'introduction de ce mémoire, il existe un véritable intérêt à étudier les protéines pariétales des végétaux. Elles interviennent dans de multiples processus cellulaire tels la sénescence, la réponse aux pathogènes, la croissance… Même chez les espèces végétales modèles, peu de protéines pariétales ont été isolées et caractérisées. L'objectif de ce mémoire est d'identifier des gènes codant pour ce type de protéines dans des racines de chicorée industrielle, par la technique du criblage immunologique.

Dans les chapitres qui suivent, nous allons ainsi voir que les protéines pariétales de racines de chicorée ont été isolées et partiellement caractérisées. Des tests « cup plate » et des zymogrammes sur gels d'électrophorèse ont été réalisés pour confirmer la présence d'estérases dans ces échantillons. Les estérases nous intéressent plus particulièrement car ce sont des enzymes qui libèrent des groupements méthyles et acétyles des pectines. La mise au point d'un sérum contre ces enzymes a été envisagée, mais n'a pu se faire à cause des faibles quantités de protéines disponibles. Le polysérum qui a finalement servi à cribler la banque d'expression, a donc été développé contre des extraits protéiques pariétaux totaux.

Le choix de la banque utilisée lors de notre criblage s'est porté sur celle mise au point par JM Schaus en 2001. C'est une banque d'expression de racines de chicorée qui a déjà servi au laboratoire à identifier par un criblage immunologique un clone codant pour une sucrose synthase.

Matériel et méthodes

2.1 Extraction des protéines pariétales

Principe

L'extraction des protéines pariétales, liées par des interactions ioniques à la paroi végétale, nécessite un traitement salin des parois. Les différentes étapes de cette extraction visent tout d'abord à solubiliser les composants cytoplasmiques et membranaires et ensuite à rompre les liaisons entre les protéines et les polysaccharides pariétaux (Thonar et *al.*, soumis 2005).

Matériel végétal

Les racines de chicorée utilisées dans ce travail proviennent d'individus prélevés en champ et directement plongés dans l'azote liquide pour leur préservation optimale. Elles sont broyées finement dans l'azote liquide en utilisant un pilon et un mortier préalablement chauffés à 180°C durant une nuit dans un four Pasteur puis refroidis avant utilisation.

Protocole

Matériel

Un tampon d'extraction phosphate : K_2HPO_4 2 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH7
Un tampon d'extraction succinate NaCl : succinate de sodium 0,05 M, NaCl 1 M, pH5
Ces tampons sont conservés à 4°C.
Une membrane millipore : Millex HP cut off de 0,45 µm (n°cat : SLHP033NS)
Une membrane de dialyse : référence : Spectra/por6, cut off 1,000K
Colonne de concentration millipore Amicon Ultra 15 5K (n° cat : UFC 900 596)

Protocole (figure 20)

Jour 1 : extraction des protéines (toutes les étapes sont à réaliser sur glace à 4°C)

- Peser 4gr de racine de chicorée finement broyée et mettre en suspension dans 20 ml de tampon d'extraction phosphate. Agiter sur plateau durant 30 minutes à vitesse maximale à 4°C.
- Centrifuger l'homogénat à 15000 rpm pendant 25 minutes.
- Eliminer rapidement le surnageant (= fraction protéique F1 conservée à –20°C pour une analyse ultérieure).
- Re-suspendre le culot dans 20 ml de tampon d'extraction phosphate. Agiter 30 minutes.
- Centrifuger l'homogénat à 15000 rpm pendant 25 minutes.
- Éliminer le surnageant (= fraction protéique F2)
- Suspendre le culot dans 20 ml de tampon d'extraction succinate NaCl. Agiter durant 30 minutes à vitesse maximale.
- Centrifuger l'homogénat à 15000 rpm durant 25 minutes.
- Récupérer le surnageant qui est centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est re-suspendu dans 10 ml de tampon d'extraction phosphate ; il constitue la fraction protéique n° 3 (= F3) et est conservé à –20°C.
- Le surnageant (F4) est récupéré et filtré avec une membrane millipore ayant un cut off de 0,45 µm avant d'être introduit dans une membrane de dialyse. Le contenu de la membrane est dialysé une nuit contre de l'eau distillée à 4°C.

Jour 2 : concentration des protéines

- Récupérer le contenu de la membrane de dialyse (fraction des protéines pariétales F5).
- Concentrer la fraction protéique F5 avec une colonne de concentration millipore ultrafree biomax jusqu'à atteindre un volume d'environ 300 µl.
- La fraction concentrée (F6) est divisée en aliquotes de 30 µl et stockée immédiatement à –80°C.
- La fraction contenant les molécules de taille inférieure à 5kDaa constitue la fraction F7.

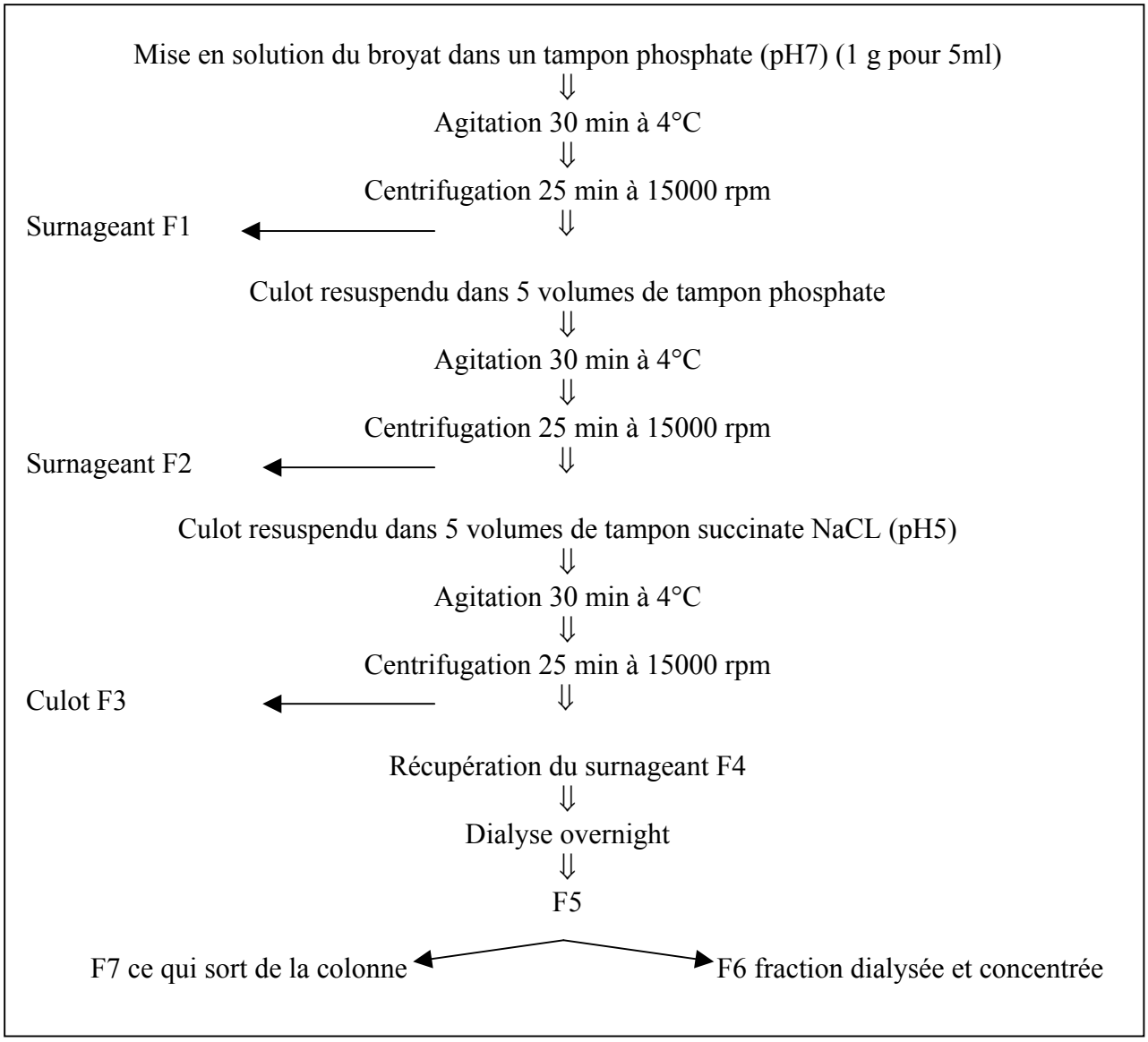


Figure 20 : schéma de la procédure d'extraction des protéines pariétales.

2.2 Caractérisation des extraits protéiques

2.2.1 Dosage Bradford

Principe
Cette technique utilise un colorant, le bleu de Coomassie dont la coloration change après adsorption (fixation non covalente) sur des protéines. La fixation est quantitative et peu sensible à la nature des protéines, il en permet donc le dosage.

Matériel
Bio-Rad protein Assay
BSA (Sigma A7030) : stock 2 mg/ml en PBS
Spectromètre (Shimadzu, UV 1601 PC)

Protocole
- préparer une gamme étalon de 40 à 200 µg/ml de BSA
- déposer 50 µl de chacune des solutions étalons dans des tubes en verre. Le blanc étant constitué de 50 µl d'eau désionisée.
- mettre également 50 µl des échantillons à doser dans des tubes
- ajouter 950 µl de réactif de dosage préalablement dilué 5x dans de l'eau désionisée
- vortexer, laisser reposer 5 minutes et lire l'absorbance à 595 nm
- déterminer la concentration en protéines de l'échantillon à partir de la droite de régression obtenue.

2.2.2 Test d'activité estérase en cup plate

Principe
Ce type de test est intéressant car il permet de mettre rapidement en évidence l'activité estérase des protéines pariétales des différents individus analysés. L'α-naphtyl acétate une fois hydrolysé par une estérase libère un naphtol qui va réagir avec un colorant diazoïque, ici l'o-dianisidine, ce qui va donner un précipité coloré.

Matériel Tampon phosphate 100 mM, pH6

Agarose 0,75%
Acétone et eau distillée
Solution de révélation : O-dianisidine (Sigma D-9805)
α-naphtyl acetate (Sigma N-8505)

Protocole
Mélanger 9,4 ml de tampon phosphate avec 20 mg d'O-dianisidine. Séparément, dissoudre 6 mg de Naphtyl acetate dans 300 µl d'eau + 300 µl d'acétone. Solubiliser par chauffage 150 mg d'agarose dans 10 ml de tampon phosphate. Ensuite, mélanger les différentes solutions en commençant par les deux premières. Couler sans tarder le mélange dans une boîte Pétri et laisser durcir dix minutes à l'obscurité. Réaliser des puits à l'aide d'un tips et y déposer 20 µl d'échantillon à tester. Incuber 30 minutes à l'étuve, on note l'apparition d'un anneau coloré.

2.2.3 Electrophorèse en gel non dénaturant

Principe
Les zymogrammes ou gels non dénaturants, permettent la mise en évidence des activités enzymatiques des extraits protéiques déposés. Les principales différences par rapport aux gels dénaturants sont :

qu'il n'y a pas de SDS dans les tampons (de migration et de chargement), ni de β mercaptoéthanol dans le tampon de chargement et que les échantillons ne sont pas bouillis.

Matériel

- tampon d'électrophorèse : Tris 25 mM, 192 mM glycine, pH 8,3
- tampon de chargement : Tris 50 mM, glycérol 15%, pH 6,8
- acrylamide/bis 30% (BioRad)
- APS (ammonium persulfate) 10%
- TEMED (N,N,N',N', tetraméthyl-éthylènediamine)
- Solution de révélation :
  - 47 ml de tampon phosphate 100 mM pH 6
  - 50 mg d'O-dianisidine
  - 1,5 ml d'eau et 1,5 ml d'acétone avec 15 mg d'α-naphtyl acétate à ne mélanger qu'au dernier moment
- Composition des gels

	Running gel 9% (4ml)	Stacking gel (2ml)
H2O	1520 µl	1355 µl
acrylamide/bis 30%	1200 µl	290 µl
Tris HCl 1,5M pH8,8	1000 µl	
Tris HCl 0,5M pH6,8		625 µl
TEMED	5 µl	5 µl
APS 10%	250 µl	200 µl

Protocole

- Après avoir ajouté les deux catalyseurs (APS et TEMED) au mélange acrylamide-bisacrylamide, couler le running gel entre les deux plaques de verre séparées par les spaceurs. Placer de l'éthanol en surface pour éviter la formation de bulles d'air.
- Après polymérisation de ce gel (environ 30 minutes mais tout dépend de la température ambiante), placer le peigne et couler le stacking gel.
- Laisser ce gel polymériser 30 minutes, placer le montage dans la cuve à électrophorèse remplie avec du tampon d'électrophorèse froid, et enlever le peigne. Ensuite, rincer les puits pour éviter qu'un reste d'acrylamide ne polymérise.
- Ajouter 5 µl de tampon de chargement aux échantillons et déposer le tout sur gel.
- La migration s'effectue à 4°C. Une tension de 100 Volts est appliquée durant 1h45.
- La solution de révélation est préparée extemporanément pour éviter la précipitation des composants. Le gel est directement plongé dans cette solution et y est maintenu à l'obscurité dans une étuve à 30°C jusqu'à apparition des bandes réactionnelles.

2.3 Caractérisation du polysérum

Pour immuniser efficacement un animal de 1 kg il est nécessaire de lui injecter 15µg d'Ag/kg et il faut faire au minimum deux rappels (Tijssen P., 1985). La quantité de protéines pariétales extraites estimée suite au dosage Bradford étant trop faible pour immuniser un lapin, c'est donc un animal plus petit qui a été choisi. Une souris a reçu en sous cutané trois boosts (espacés de un mois) contenant chacun 1,2 µg de protéines pariétales de chicorée et 120 µl de QuilA à 0,33 mg/ml en PBS.

2.3.1 Dot blot

Principe

La technique du dot blot permet d'évaluer la spécificité et de titrer un polysérum dirigé contre un antigène donné.

Matériel

Tampon TBS : - Tris HCl 20 mM (pH7.6)
- NaCl 137 mM

Tampon TBST :- Tampon TBS + 0,1% de Tween 20

Tampon de saturation : Tampon TBST + 5 % de poudre de lait

Anticorps secondaire : Anti-mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate, developped in goat (Sigma A3562)

Pour la révélation colorimétrique :

Tampon : Tris HCl 0,1N pH 9,5 ; Mg Cl_2 0,05M

NBT : 4-nitro blue tetrazolium chloride

BCIP : 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl phosphatase

Protocole pour la préparation d'un lysat d'E. coli

- Inoculer 5 ml de LB avec une colonie isolée de XL1 blue MRF'. Incuber à 37°C quelques heures sous agitation.
- Ensemencer 1 litre de LB avec la préculture. Incuber une nuit à 37°C.
- Centrifuger la culture 10 minutes à 4°C et 6000 rpm.
- Resuspendre dans 30 ml de Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, pH8.
- Congeler – décongeler 2x.
- Soniquer 10 périodes de 20 secondes.
- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 13000 rpm, récupérer le surnageant et le mettre à -20°C.
-

Protocole

1. Découper un morceau de la taille appropriée de membrane PVDF
2. Incuber la membrane cinq secondes dans le méthanol puis directement dans de l'eau désionisée pendant 5 minutes.
3. Déposer 1 µl d'échantillon directement sur la membrane.
4. Laisser pénétrer l'échantillon durant 1 minute.
5. Incuber la membrane avec l'agent bloquant (TBST+BSA 3%) à température ambiante durant une heure sous agitation. Cette étape de saturation empêche la liaison anarchique des anticorps primaires à la surface de toute la membrane.
6. Laver ensuite la membrane sous agitation avec du TBST selon la séquence suivante : 1x 2 minutes, 1x 15 minutes, 1x 2 minutes.
7. Incuber la membrane dans l'anticorps primaire épuisé durant une heure à température ambiante et sous agitation.
8. Laver la membrane dans la solution TBST selon la séquence présentée en 6.
9. Incuber la membrane avec l'anticorps secondaire (dilué 10000 fois dans une solution TBST + BSA 1%) une heure à température ambiante et sous agitation.
10. Laver la membrane comme au point 6.
11. Faire un bref lavage dans le tampon de révélation sans les réactifs.
12. Révélation : à 10 ml de tampon de révélation, ajouter 50 µl de NBT et 37,5 µl de BCIP, y placer les membranes et incuber à l'obscurité jusqu'à apparition de spots colorés (cette réaction peut prendre quelques minutes). Arrêter la réaction en transférant la membrane dans l'eau.

Différents contrôles sont réalisés de manière à vérifier la spécificité de la reconnaissance des extraits protéiques pariétaux par le sérum immun. Ainsi, parallèlement au test du sérum immun sur des extraits protéiques pariétaux, l'anticorps secondaire seul est testé contre ces extraits, il constitue un contrôle négatif. Le sérum naïf (pré-immun) est utilisé pour vérifier que c'est bien suite à l'immunisation que le sérum de souris permet l'identification des protéines pariétales de chicorée. L'épuisement de chaque polysérum est nécessaire avant de pourvoir utiliser le sérum pour le criblage de banque. Un animal produisant naturellement des anticorps dirigés contre des protéines d' *E.coli*

Epuisement de l'anticorps

exemple : pour un volume final de 4ml, et une dilution finale 1000X de l'anticorps primaire il faut : diluer le sérum 500x dans 2 ml de TBST + BSA 1% et y ajouter 2ml de lysat bactérien.

2.3.2 Western blot

Electrophorèse en gel SDS-PAGE

Matériel

- tampon de migration : Tris 25 mM, 250 mM glycine, 0,1% SDS
- tampon de chargement : Tris 50 mM, glycérol 15%, pH 6,8
- acrylamide/bis 30% (BioRad)
- SDS 10%
- APS (ammonium persulfate) 10%
- TEMED (N,N,N',N', tetraméthyl-éthylènediamine)
- Solution de coloration : 40% méthanol ; 10% acide acétique ; 0,1% de bleu de Coomassie
- Solution de décoloration : acide acétique 10%, MeOH 40%
- Composition des gels

Protocoles

	running gel (12%)	stacking gel
Eau	1600 µl	1600 µl
Tris 1,5M pH 8,8	1300 µl	
Tris 1M pH 6,8		260 µl
acrylamide	2000 µl	340 µl
SDS 10%	50 µl	20 µl
APS 10%	50 µl	20 µl
TEMED	20 µl	2 µl

- Protocole de préparation des gels identique à celui du gel non dénaturant (confère point 2.2.3).
- Préparation des échantillons protéiques : diluer les extraits protéiques 2x dans du tampon de migration, faire bouillir 10 minutes à 100°C, ajouter 5 µl de tampon de chargement avant de les déposer sur gel.
- Après migration durant 1 heure à 110 Volt, coloration des gels dans une solution de bleu de Coomassie, puis décoloration (une demi heure sous légère agitation).

Transfert

Matériel

Tampon de transfert
- Tris 48 mM
- Glycine 39 mM
- Méthanol analytique 20%
- SDS 0,0375%

Appareil de transfert : Bio-Rad trans-blot SD

Protocole

- Découper un morceau de membrane de PVDF correspondant à la taille du gel SDS-PAGE.

- Incuber la membrane de PVDF quelques secondes dans le méthanol puis directement 5 minutes dans de l'eau désionisée.
- Equilibrer la membrane et les papiers absorbants dans le tampon de transfert durant minimum 30 minutes.
- Après l'électrophorèse, équilibrer le gel dans le tampon de transfert 3 à 4 minutes et assembler le montage de l'appareil semi-dry en évitant la formation de bulles d'air.
- Laisser opérer le transfert des protéines du gel SDS-PAGE vers la membrane de PVDF pendant 25 minutes sous une alimentation de 15 Volts.

Marquage du western blot (confère protocole dot blot à partir de l'étape 5).

2.4 Criblage de la banque

2.4.1 Description de la banque

L'ADNc, obtenu suite à la transcription reverse de l'ARNm issu de quatre racines de chicorée de la variété *Nausica* prélevées à différents temps, a été cloné de manière directionnelle dans un vecteur (phagemide) appelé UNI-ZAP XR permettant le clonage de grands inserts (0 à 10 kb). Ce vecteur contient un plasmide pBluescript au niveau duquel est cloné l'ADNc. Les inserts sont clonés dans le MCS (site multiple de clonage) entre les sites de restriction XhoI et EcoRI du pBluescript, en aval d'un promoteur lactose (Plac). Ce pBluescript peut être excisé du phagemide UNI-ZAP XR de manière à caractériser l'insert dans un système plasmidique plus facilement manipulable. Les vecteurs recombinants ainsi constitués ont été ensuite encapsidés dans des phages λ ZAP. La banque ainsi obtenue, disponible au laboratoire, a un titre de 1,2 10^5 pfu/ml. Elle a permis l'isolement d'une séquence d'ADNc contenant tout l'ORF codant pour une sucrose synthase de chicorée (JM Schaus, pectinet).

2.4.2 Criblage de la banque

Matériel

- Membrane de nitrocellulose : Hybond-C extra, 82 mm, Amersham Pharmacia Biotech, RPN 82E
- Banque d'expression λ ZAP préparée au départ de racines de chicorée (variété *Nausica*) prélevées à quatre temps différents durant la saison 2001 (protocole de construction de la banque voir kit stratagene : cDNA synthesis kit, Zap-cDNA synthesis kit, and ZAP-cDNA Gigapack III Gold cloning kit).

milieu de culture : pour un litre

LB	LB + agar	NZYagar	NZY top agar
10g bactotryptone 10g NaCl 5g yeast extract technical pH 7	idem LB + 15g agar pH 7	15g Agar 2g MgSO4 5g yeast extract technical 10g casein, acid hydrolysate 5g NaCl pH 7,5	7g Agarose 2g MgSO4 5g yeast extract technical 10g casein, acid hydrolysate 5g NaCl pH7,5

Les milieux préparés sont autoclavés durant au minimum 20 minutes à 120°C sous une pression du 1 bar.

Infection

→ Préparation des bactéries

1. Strier le stock glycérol de bactéries XL1 blue MRF' sur milieu LB additionné de tetracycline (12,5 µg/ml final) et incuber une nuit à 37°C. La boîte est ensuite stockée à 4°C durant maximum 3 semaines.
2. Inoculer 50 ml de milieu LB, additionné de $MgSO_4$ (10 mM final) et de maltose (0.2% final), avec une colonie isolée.
3. Incuber une nuit à 30°C à faible agitation (150 rpm). Laisser croître jusqu'à une valeur de DO_{600} de 1,0.
4. Centrifuger les bactéries 10 minutes à 4500rpm et éliminer le surnageant.
5. Resuspendre les bactéries dans ½ volume initial de $MgSO_4$ 10mM.
6. Diluer les bactéries avec du $MgSO_4$ jusqu'à obtention d'une valeur de DO_{600} de 0,5.
7. Maintenir les bactéries à 4°C jusqu'à utilisation.

→ Infection

1. Mélanger 300µl de bactéries diluées dans du $MgSO_4$ (DO_{600} de 0,5) avec 6000 pfu (plaque forming unit) de la banque amplifiée (titre $4.2x10^5$ pfu/µl). Faire 20 infections de façon à être représentatif de la banque initiale (titre $1,2x10^5$ pfu/µl).
2. Incuber 20 minutes dans un bain à 37°C.
3. Ajouter 3.5 ml de NZY Top agar (autoclavé et maintenu à 48°C).
4. Verser le mélange sur boîte de Pétri contenant du NZY agar (préchauffé à 37°C) et laisser sécher 10 minutes.
5. Inverser la boîte et incuber à 42°C 4 à 5 heures jusqu'à apparition des plages de lyse.

Empreinte

1. Quand la taille des plages de lyse atteint 1-2 mm, réaliser une empreinte sur membrane de nitrocellulose)

en procédant de la manière suivante :

- Marquer les membranes au bic (repères).
- Tremper les membranes 1 minute dans l'eau, sécher.
- Tremper les membranes 1 minute dans une solution d'IPTG 10 mM, sécher.
- Déposer les membranes délicatement sur le tapis bactérien contenant les plages de lyse. Piquer au niveau des repères avec une aiguille au travers de l'agar.

2. Incuber à 37°C durant 3 heures puis transférer ½ heure à 4°C.
3. Retirer délicatement les membranes, les laver avec du TBST 0,1% et les stocker à 4°C.

Immunomarquage des empreintes

→ Matériel

Anticorps primaire épuisé

Anticorps secondaire et solution de révélation : idem dot blot

→ Protocole

Idem dot blot à partir du point 5

2.5 Excision d'un clone positif

Principe

Pour rappel la banque d'expression a été construite dans des phages λ-ZAP. Ces derniers contiennent un vecteur de type phagemide (UNI-ZAP XR) englobant toute la séquence du vecteur pBluescript (figure 21) au niveau duquel sont clonés les ADNc dérivés des ARNm de chicorée. Ce vecteur pBluescript est mieux adapté pour les manipulations ultérieures notamment le séquençage. Il peut être excisé du phagemide grâce à un phage helper. En résumé, des bactéries XL1 blue MRF' sont co-infectées avec les phages λ-ZAP provenant d'une plage de lyse d'intérêt et par un phage helper (ExAssist) qui code pour les protéines qui vont exciser le vecteur pBluescript. Celui-ci est re-circularisé dans les bactéries (XL1 bue MRF') et les particules de phage helper l'ayant intégré sont produites dans le milieu de culture. Les bactéries utilisées pour ce processus d'excision sont ensuite tuées par chauffage à 65-70°C et enlevées du milieu de culture par centrifugation. Le surnageant contenant les phages est ensuite mélangé avec d'autres *E. coli* (SOLR) qui après infection, sont étalées sur du milieu sélectif. Dans les bactéries SOLR il n'y a pas de co-infection, cette souche contrairement au XL1 blue MRF' est non suppressive. Le phage helper contenant un codon ambre dans sa séquence ne sait pas se répliquer dans les souches non suppressives.

Matériel - Milieu SM pour 1 litre : 2 g $MgSO_4$. 7 H_2O, 5,8 g NaCl, 50 ml de Tris HCl 1M (pH 7,5), 5 ml de gelatine 2%

Amplification du phage helper (ExAssist)

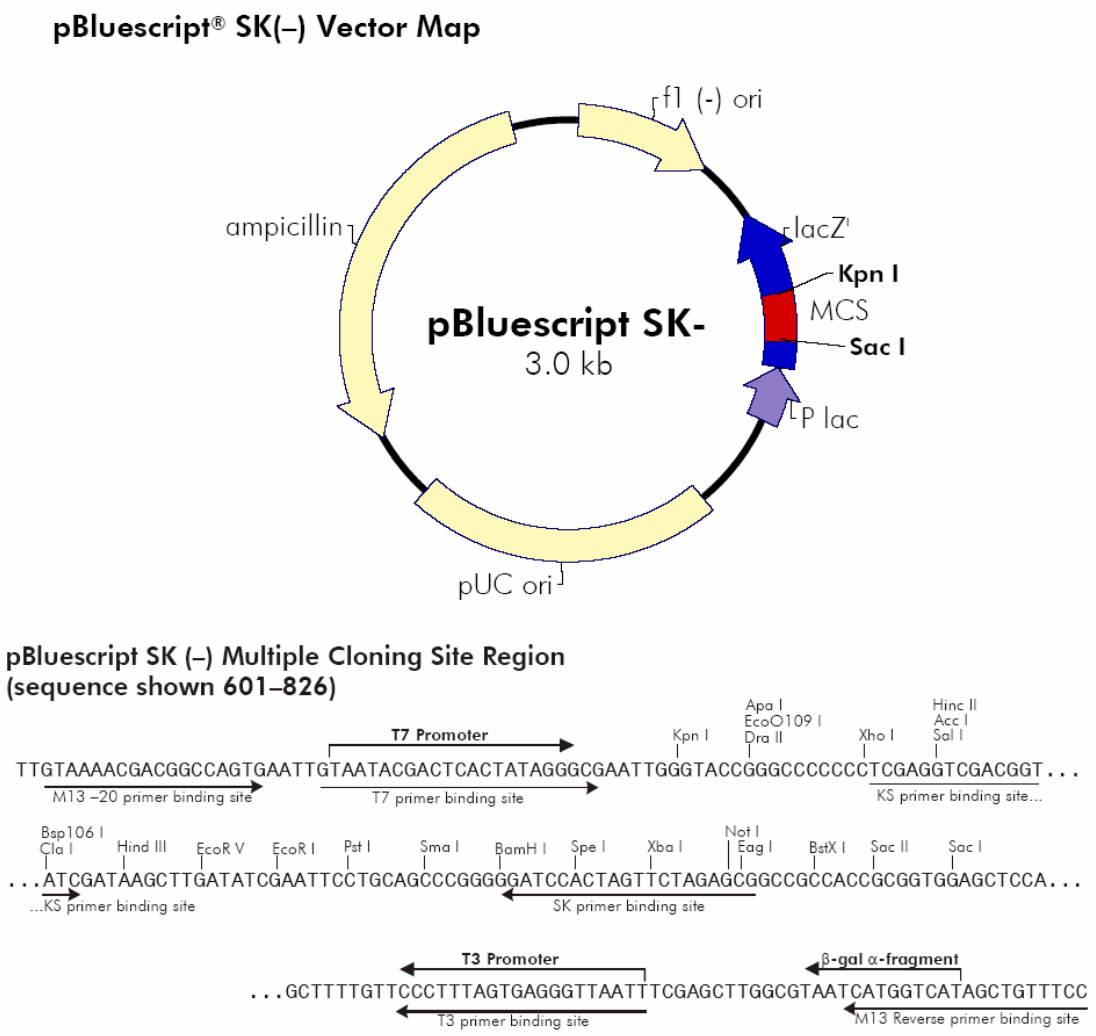
1. Transférer une colonie de XL blue MRF' dans 10 ml de LB additionné de $MgSO_4$ (10mM final) et de maltose (0,2% final) dans un falcon de 50 ml. Incuber le tout à 37°C sous agitation (220 rpm) et laisser croître jusqu'à une DO_{600} de 0,3.
2. Ajouter le phage helper (ExAssist)(10µl de phages à 10^{10} pfu/ml dans 10 ml de bactéries)
3. Incuber le tube à 37°C durant 15 minutes pour permettre aux phages de s'attacher aux bactéries.
4. Incuber le tube sous agitation (220 rpm) à 37°C pendant 8 heures.
5. Chauffer le tube durant 15 minutes à 65°C.
6. Centrifuger les débris cellulaires et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
7. Ajouter du diméthylsulfoxide (DMSO) à une concentration finale de 7% (v/v) et stocker à -80°C.

Titration du phage helper

1. Transférer une colonie de XL1 blue MRF' dans 10 ml de LB contenant du $MgSO_4$ 10mM final et du maltose 0,2% final. Incuber dans un falcon de 50 ml sous agitation (220 rpm) à 37°C. Laisser croître jusqu'à une DO_{600} de 1,0.
2. Diluer le phage de 10^4 à 10^7 dans du tampon SM et combiner 1 µl de chaque dilution avec 200µl de bactéries XL1 blue MRF' (DO_{600} de 1,0).
3. Incuber le phage helper et les bactéries 15 minutes dans un bain à 37°C pour permettre aux phages de s'attacher aux bactéries.
4. Ajouter 3 ml de NZY top agar, autoclaver et refroidit à 48°C, couler sur une boite NZY agar préchauffées. Laisser sécher durant 10 minutes.
5. Inverser les boîtes et incuber la nuit à 37°C.
6. Pour déterminer le titre en « unité formant plaque par millilitre » (pfu/ml) : utiliser la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de plaques (pfu) x facteur de dilution}}{\text{Volume par boîte (µl)}} \times 1000$$

où le volume par boîte (en microlitre) se réfère au volume de la solution de phages helper ajoutée aux bactéries.



Feature	Nucleotide Position
f1 (–) origin of ss-DNA replication	24–330
β-galactosidase α-fragment coding sequence (lacZ′)	463–816
T7 promoter transcription initiation site	643
multiple cloning site	653–760
T3 promoter transcription initiation site	774
lac promoter	817–938
pUC origin of replication	1158–1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF	1976–2833

Figure 21 : carte circulaire du phagemide pBluescript SK(-) et description de ses caractéristiques principales

Protocole d'excision d'un clone

Jour 1

1. La plage de lyse localisée sur la boîte de culture à l'aide de repères et reconnue par l'anticorps sur les membranes de nitrocellulose correspondante est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Le cône d'agarose contenant les phages est mis à diffuser dans 0,5 ml de milieu SM additionné de 20µl de chloroforme durant au minimum une nuit à 4°C.
2. Durant la nuit, des bactéries XL1 blue MRF' et SOLR sont mises à pousser séparément à 30°C dans du milieu LB additionné de $MgSO_4$ 10mM final et de maltose 0,2% final.

Jour 2

1. Centrifuger les bactéries. Resuspendre le culot dans 25 ml de MgSO4 10mM, mesurer la DO_{600} des suspensions, puis ajuster les volumes pour atteindre une DO_{600} de 1,0 dans le MgSO4.
2. Combiner les composants suivants dans un tube de culture :
   - 200µl de XL1 blue MRF' ayant une DO_{600} de 1,0
   - 250µl du stock de phages (contenant au moins 1 x 10^5 particules)
   - 1µl du phage helper ExAssist (au moins 1 x 10^6 pfu/µl)
3. Incuber le tout à 37°C durant 15 minutes pour permettre aux phages de s'attacher aux bactéries.
4. Ajouter 3 ml de LB contenant du $MgSO_4$ 10mM et du maltose 0,2% et incuber 2,5 à 3 heures à 37°C sous agitation.
5. Chauffer le tube à 65-70°C durant 20 minutes pour lyser le phage lambda et les bactéries. Centrifuger le tube à 4500 rpm pendant 15 minutes pour culotter les débris cellulaires.
6. Récupérer le surnageant dans un Falcon stérile. Ce stock contient le phagemide pBluescript empaqueté dans des particules de phages helper. (Ce stock peut être conservé 1-2 mois à 4°C).
7. Mélanger 200µl de bactéries SOLR fraîchement préparées (DO_{600} de 1.0) dans deux tubes Eppendorfs, avec 100 µl du surnageant contenant le phage filamenteux dans un tube et de 10 µl de ce même surnageant dans l'autre tube.
8. Incuber les Eppendorfs à 37°C pendant 15 minutes.
9. Etaler 200 µl de chaque mélange sur des boîtes LB-ampicilline (100µg/ml) et incuber les boîtes à 37°C pendant une nuit.

2.6 PCR et gel d'agarose

2.6.1 PCR

En vue du séquençage des inserts contenus dans le vecteur pBluescript, une PCR est réalisée avec les amorces M13 pBs Forwart et Reverse s'hybridant sur le vecteur de part et d'autre de ces inserts.

- *Matériel* : pour un mélange PCR de 50 µl
  - 5 µl de tampon 10x concentré (BioLabs, M0267L)
  - 0,5 µl de Taq DNA polymérase (BioLabs, M0267L ; 5,000U/ml)
  - 1 µl dNTP 10 mM
  - 0,5 µl d'amorce forward M13pBs 100 pmol/µl
  - 0,5 µl d'amorce reverse M13pBs 100 pmol/µl
  - 1 µl de matrice
  - compléter à 50 µl avec de l'eau désionisé

Nombre de cycle PCR

température	temps	étape	nombre de cycle
94°C	3 min	dénaturation	1X
94°C	1 min	dénaturation	30X
55°C	0,5 min	hybridation	30X
75°C	2,5 min	élongation	30X
75°C	10 min	élongation finale	1X

2.6.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

- *Matériel*
  Cuve d'électrophorèse (Pharmacia biotech GNA 100).
  Agarose (Gibco BRL).
  Tampon TAE : Tris acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH8.
  Bromure d'éthidium (BET): stock à 10 mg/ml
  Solution de chargement : bleu de bromophénol 0,025% glucose 40%.

- *Protocole*
  1. Préparer 50 ml d'agarose 1% dans du tampon TAE et y ajouter 3 µl de BET.
  2. Couler le gel dans un support adéquat et placer les peignes.
  3. Ajouter 1 volume de solution de chargement à 5 volumes d'échantillon.
  4. Après solidification, placer le gel dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE.
  5. Déposer dans les puits le volume adéquat d'échantillon.
  6. Faire migrer l'échantillon pendant environ 1 heure sous 80 mA.
  7. Visualiser les acides nucléiques sur transilluminateur (303 nm UV).

2.6.3 Purification du produit PCR

Matériel
Colonne Microcon YM-100 (Amicon, n°Cat 42413)

Protocole
1. Dans un tube eppendorf, mélanger 380 µl d'H_2O avec 20 µl de produit PCR
2. Déposer ce mélange sur une colonne Microcon placée dans un tube eppendorf et centrifuger à 4000 rpm pendant 12 min à température ambiante.
3. Retourner la colonne et la placer dans un nouveau tube eppendorf. Déposer 10 µl d'H2O au centre de la colonne, attendre 5 min puis centrifuger à 4000 rpm durant 12 min. Répéter l'élution.
4. Conserver l'éluat à -20°C.

2.7 Séquençage d'ADN

Le séquençage des inserts a été effectué au sein de notre laboratoire par N. Dauchot à l'aide d'un kit CEQ DTCS quick start kit (Beckman 608120) (méthode du dye terminator) sur un séquenceur Beckman CEQ 8000. Les séquences ont été analysées grâce au programme Vector NTI.

Résultats et discussion

Dans le but d'identifier des gènes codant pour des enzymes pariétales de racine de chicorée, un polysérum de souris a été mis au point. Il a servi à cribler une banque d'expression qui contient l'ensemble des gènes exprimés par une racine de chicorée à un moment donné.

Dans un premier temps, nous discuterons de la préparation et de la caractérisation des extraits protéiques pariétaux, notamment de leur activité estérase et ce, dans le prolongement du travail de C. Thonar (article à paraître). Une deuxième partie sera consacrée à la caractérisation du polysérum mis au point grâce aux protéines pariétales isolées, au point de vue de sa sensibilité et de sa spécificité. Pour ce faire deux techniques ont été utilisées : la technique du dot blot et celle du western blot. La troisième partie traitera du criblage de la banque en lui-même. Enfin nous envisagerons le séquençage d'un clone obtenu suite au criblage et des prédictions quant à sa structure, grâce à différents programmes informatiques.

3.1 Extraction des protéines

La première étape de ce mémoire a consisté à isoler des protéines pariétales de chicorée. Les échantillons ont été choisis en accord avec les résultats, obtenus par C. Thonar, qui montraient la présence d'une activité estérase. Pour rappel, la dé-estérification des pectines est une étape préliminaire indispensable pour leur dégradation mais les connaissances concernant les enzymes de dégradation sont généralement lacunaires, en particulier chez les astéracées dont la chicorée. Les échantillons choisis pour l'extraction des protéines pariétales sont donc ceux montrant le plus d'isoformes et d'activité estérase pour la variété de chicorée *Nausica*, c'est-à-dire ceux du 30 août, du 14 novembre et du 29 novembre 2002. Trois individus ont ont été choisis pour chaque date de prélèvement.

Les protéines pariétales sont liées par des interactions ioniques à la paroi végétale. Pour les extraire, elles subissent un traitement salin qui rompt les membranes ; c'est donc une méthode disruptive. Les différentes étapes viseront à éliminer une première fraction soluble et ensuite à rompre les liaisons entre les enzymes et les polysaccharides pariétaux. Cette rupture se fera grâce à un tampon de forte molarité (du succinate NaCl 1 molaire). Les différentes étapes de la manipulation sont schématisées à la figure 20. Les étapes d'isolement des protéines et de traitement du matériel végétal sont décrites de manière plus complète dans la partie matériel et méthodes.

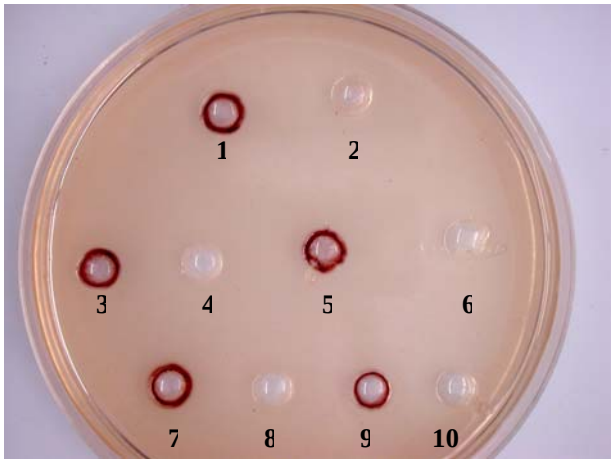
3.2 Caractérisation des extraits protéiques

3.2.1 Test « cup plate »

3.2.1.1 Avec comme substrat l'α-naphtyle acétate

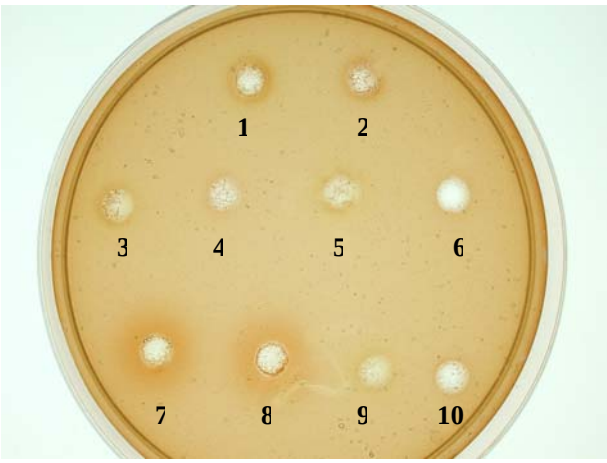
Ce substrat est intéressant car il permet de mettre rapidement en évidence l'activité estérase des protéines pariétales. L'α-naphtyle acétate, une fois hydrolysé par une estérase, libère un

naphtol qui va réagir avec un colorant diazoïque, ici l'o-dianisidine, ce qui donne un précipité coloré.



1 extrait protéique de racine récoltée le 29/11/2002
2 extrait protéique bouilli de racine récoltée le 29/11/2002
3 extrait protéique de racine récoltée le 04/08/2002 n°1
4 extrait protéique bouilli de racine récoltée le 04/08/2002 n°1
5 extrait protéique de racine récoltée e le 04/08/2002 n°2
6 extrait protéique bouilli de racine récoltée le 04/08/2002 n°2
7 acétyle estérase commerciale diluée 2x (sigma A4530)
8 acétyle estérase commerciale bouillie diluée 2x
9 PME commerciale diluée 2x (sigma P5400)
10 PME commerciale bouillie diluée 2x

Figure 22 : test cup plate avec comme substrat l'α-naphtyle acétate pour la révélation d'activité estérases. Les fractions protéiques testées sont originaires de chicorées récoltées à deux dates différentes durant la saison 2002. Les enzymes bouillies constituent un contrôle négatif et les enzymes commerciales un test positif.



1 extrait protéique de racine récoltée le 29/11/2002
2 extrait protéique bouilli de racine récoltée le 29/11/2002
3 extrait protéique de racine récoltée le 04/08/2002 n°1
4 extrait protéique bouilli de racine récoltée le 04/08/2002 n°1
5 extrait protéique de racine récoltée le 04/08/2002 n°2
6 extrait protéique bouilli de racine récoltée le 04/08/2002 n°2
7 acétyle estérase commerciale diluée 2x (sigma A4530)
8 acétyle estérase commerciale bouillie diluée 2x
9 PME commerciale diluée 2x (sigma P5400)
10 PME commerciale bouillie diluée 2x

Figure 23 : test cup plate avec comme substrat le p-nitrophényle acétate pour la révélation d'une activité estérase. Les fractions protéiques testées sont originaires de chicorées récoltées à deux dates différentes durant la saison 2002. Les enzymes bouillies constituent un contrôle négatif et les enzymes commerciales un test positif.

Ce test montre qu'une activité est détectée dans les échantillons protéiques déposés dans les puits 1, 3 et 5 (figure 22). Celle-ci ressemble aux réponses obtenues pour les échantillons commerciaux d'estérases (puits 7 et 9). Il existe donc probablement des estérases dans les extraits protéiques totaux déposés. Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, les extraits protéiques étant dénaturés par chauffage. Ceci permet de vérifier que la coloration est bien due à une activité enzymatique. Ce test avec comme substrat l'α-naphtyle acétate a pourtant un défaut majeur : il manque de spécificité. En effet, une activité acétyle estérase peut être identifiée aussi bien qu'une activité pectine méthyle estérase (pas de différence de coloration pour les deux types d'enzymes commerciales au niveau des puits 7 et 9). Il est dès lors nécessaire d'essayer d'autres substrats afin de pallier à ce manque de spécificité, par exemple avec du p-nitrophényle acétate ou encore de la triacetine.

3.2.1.2 Avec comme substrat le p-nitrophényle acétate

Le même test a été réalisé avec comme substrat le p-nitrophényle acétate. Ce substrat une fois hydrolysé libère un groupement p-nitrophénole qui réagit avec l'o-dianisidine et forme un produit coloré.

Les résultats obtenus avec ce substrat sont intéressants car une couleur différente est observée pour la PME (plus jaune, dans le puits 9) et pour l'AE (plus brun, dans le puits 7) (figure 23). Il permet donc d'identifier les individus ayant la plus forte activité AE (par exemple le puits n°1). Il apparaît cependant un problème majeur car les puits 2 et 8 semblent avoir réagi alors qu'ils sont chargés avec des échantillons bouillis 10 minutes à 100°C et qui ne devraient pas montrer d'activité. Ce type de test serait à refaire, en diluant plus fortement les enzymes commerciales pour vérifier que la différence de coloration n'est pas due à une trop forte concentration.

3.2.2 Gels semi-dénaturant

Les gels de polyacrylamide sont utilisés pour la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les électrophorèses de protéines se font en condition dénaturante afin d'éliminer l'action de facteurs (la charge, la conformation de la protéine,…) pouvant modifier la mobilité électrophorétique. La dénaturation au SDS des enzymes ne permet pas leur identification par zymogramme. Dans le cas d'un gel semi dénaturant, les enzymes sont renaturées dans une solution de triton X100 avant la révélation. Dans le cadre de ce travail, la révélation a été faite en présence d'α-naphtyle acétate qui devrait permettre l'identification des estérases sur gel.

L'échantillon de racine de chicorée de la variété *Nausica* analysé dans la figure 24 a été récolté le 29/11/2002. Une bande colorée comprise entre les poids moléculaires 37 et 25 kDa est identifiée pour les extraits protéiques totaux. Les résultats obtenus par Cécile Thonar sur des extraits protéiques issus de racines de chicorée semblent en accord avec ceux obtenus lors de notre travail. Suite à la migration des échantillons sur un gel semi-dénaturant, l'activité acétyle estérase était révélée avec de la triacétine comme substrat. La révélation avait permis l'identification d'une activité acétyle estérase aux environs des PM 65, 50 et 35 kDa (où la plus forte activité était observée). Le même type de test avait été réalisé pour identifier les activités de PME, la coloration du gel se faisant alors au rouge de ruthénium. Les PM observables sur les zymogrammes PME étaient tous supérieurs à 75 kDa pour une telle activité (C. Thonar et *al.*, 2005 soumis).

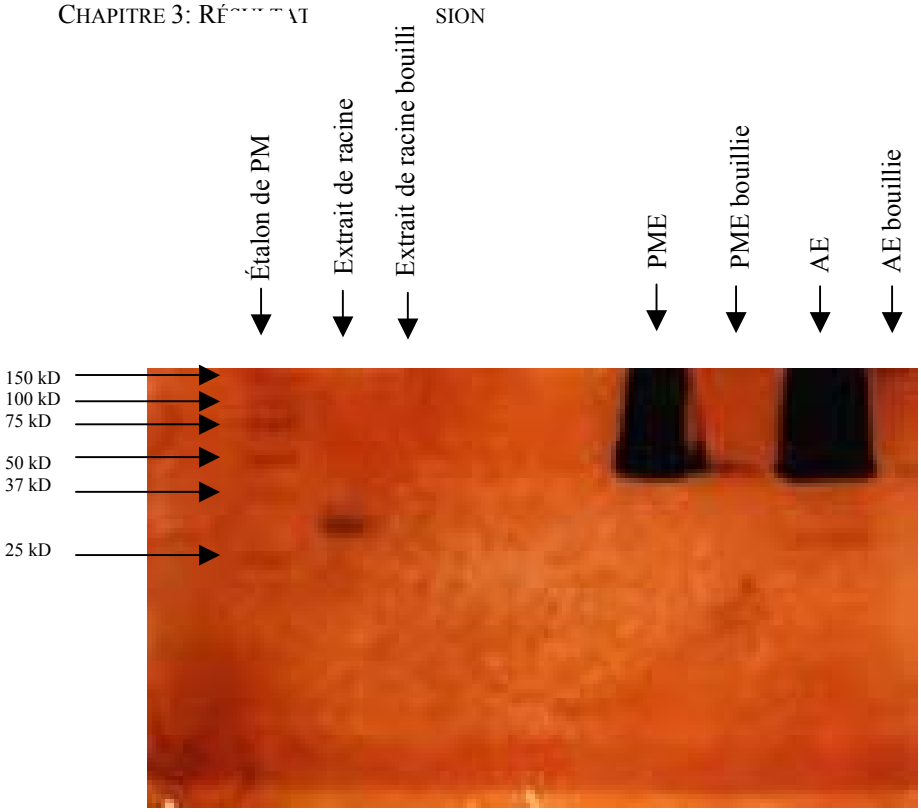
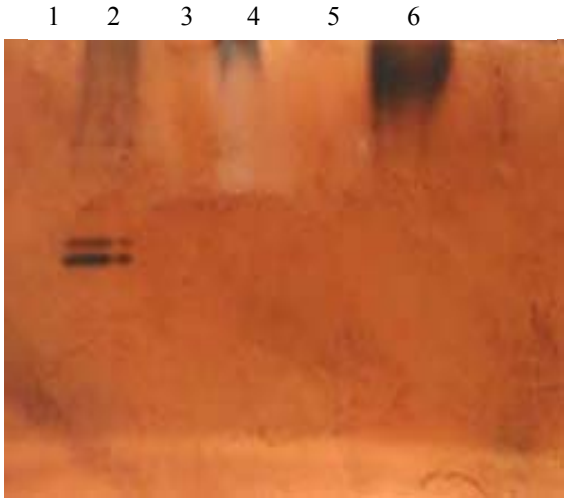


Figure 24 : gel semi dénaturant suivi d'un zymogramme pour la révélation d'une activité estérases. Les fractions protéiques de racines de chicorée testées ont été prélevées en champ le 29/11/2002.



1. extrait protéique bouilli de racine de chicorée prélevée le 29/11/2002
2. extrait protéique de racine de chicorée prélevée le 29/11/2002
3. PME commerciale sigma bouillie (D2x)
4. PME commerciale sigma (D2x)
5. AE commerciale sigma bouillie (D2x)
6. AE commerciale sigma (D2x)

Figure 25 : gel non dénaturant (sans SDS) suivi d'un zymogramme permettant la mise en évidence d'activité estérase. Les fractions protéiques de racine de chicorée testées ont été prélevées en champ le 29/11/2002.

Il est probable que l'activité révélée sur notre gel corresponde à une activité AE, au vu du poids moléculaire estimé. Les préparations commerciales d'AE et de PME d'orange (Sigma) ont été diluées dix fois mais montrent encore une activité très importante. L'acétyle estérase commerciale montre une deuxième bande aux environ de 30 kDa. Au-dessus de 75 kDa le même profil de migration est observé aussi bien pour la PME que pour l'AE. Sachant que la PME Sigma est certifiée sans activité AE et que l'AE commerciale Sigma de même substrat d'origine n'est que partiellement purifiée, nous en concluons que l'activité présente au-dessus de 75kDa pour la piste AE est constituée par des PME contaminantes.

3.2.3 Electrophorèse en conditions non dénaturantes

Ce type de gel permet la séparation des protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique mais, dans ces conditions, la migration ne s'effectue plus en fonction du poids moléculaire. En effet, les protéines sont dans leur conformation native et les tampons utilisés ne contiennent pas de SDS : elles gardent donc leur charge intrinsèque et migrent en fonction de celle-ci. Aucune indication concernant leur masse moléculaire ne peut être déduite du profil de migration obtenu. L'avantage est que l'activité des enzymes n'est pas perdue ce qui permet de les détecter. Pour identifier une activité estérase la révélation du gel s'est faite avec de l'α-naphtyle acétate comme substrat artificiel.

Dans le puits n°2, un extrait protéique issu d'une racine récoltée le 29/11/2002 a été déposé (figure 25). Suite à la révélation, deux bandes peuvent être identifiées au niveau de ce puits (contrairement au gel semi dénaturant où seule une bande était observée). Soit il s'agit des isoformes d'une même enzyme, soit ce sont des enzymes différentes ayant chacune une activité estérase puisque le substrat utilisé ne permet pas de faire la différence entre des activités AE et PME. Aucune activité plus précise ne peut être attribuée aux bandes obtenues, les enzymes commerciales ne montrant pas un profil bien défini mais plutôt une traînée qui ne permet pas de comparaison. Ce problème peut être dû à une dilution trop faible des enzymes commerciales.

3.2.4 Conclusion

Le manque de renseignements sur les estérases isolées, ainsi que les faibles quantités de protéines disponibles, nous ont forcé à revoir notre objectif initial, à savoir l'obtention d'un polysérum dirigé contre des estérases. Suite au dosage Bradford nous avons estimé que nous n'avions que 8,8 µg de protéines pariétales à notre disposition. Pour immuniser efficacement un animal de 1 kg, il était nécessaire de lui injecter 15µg d'Ag/kg avec au minimum deux rappels (Tijssen P., 1985). Nous avons finalement décidé d'inoculer les extraits protéiques pariétaux totaux qui nous permettaient tout juste d'immuniser une souris.

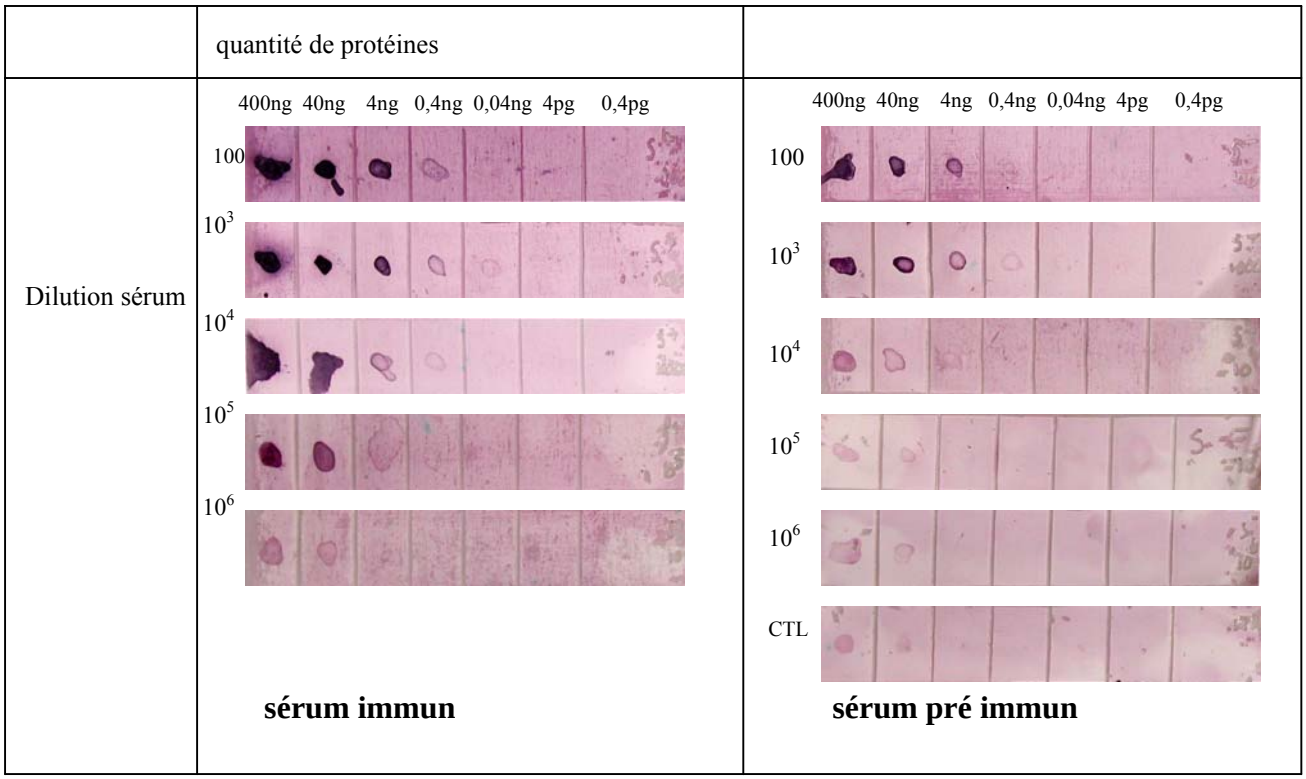


Figure 26 : dot blot réalisé dans des conditions de non épuisement de l'anticorps primaire. Réalisé dans le but d'identifier la dilution du polysérum qu'il faudra utilisé lors du criblage et de tester sa sensibilité.

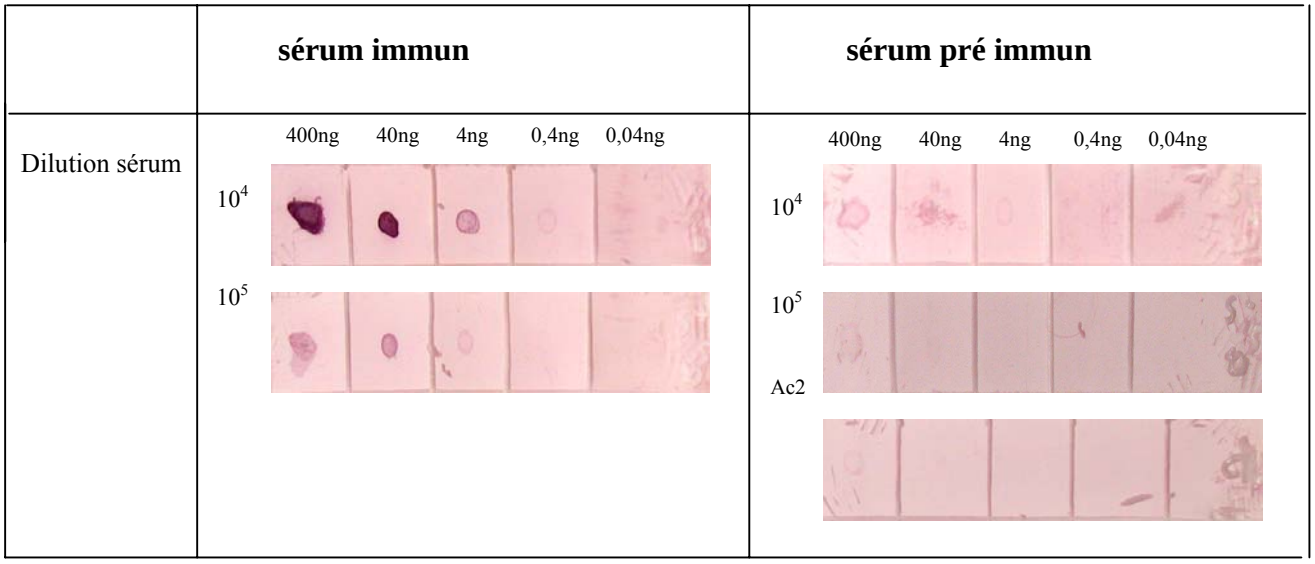


Figure 27 : dot blot réalisé dans des conditions d'épuisement maximal de l'anticorps primaire (1 volume Ac dilué 10^4x / 1 volume de lysat bactérien). Test des conditions de révélation utilisée lors du criblage.

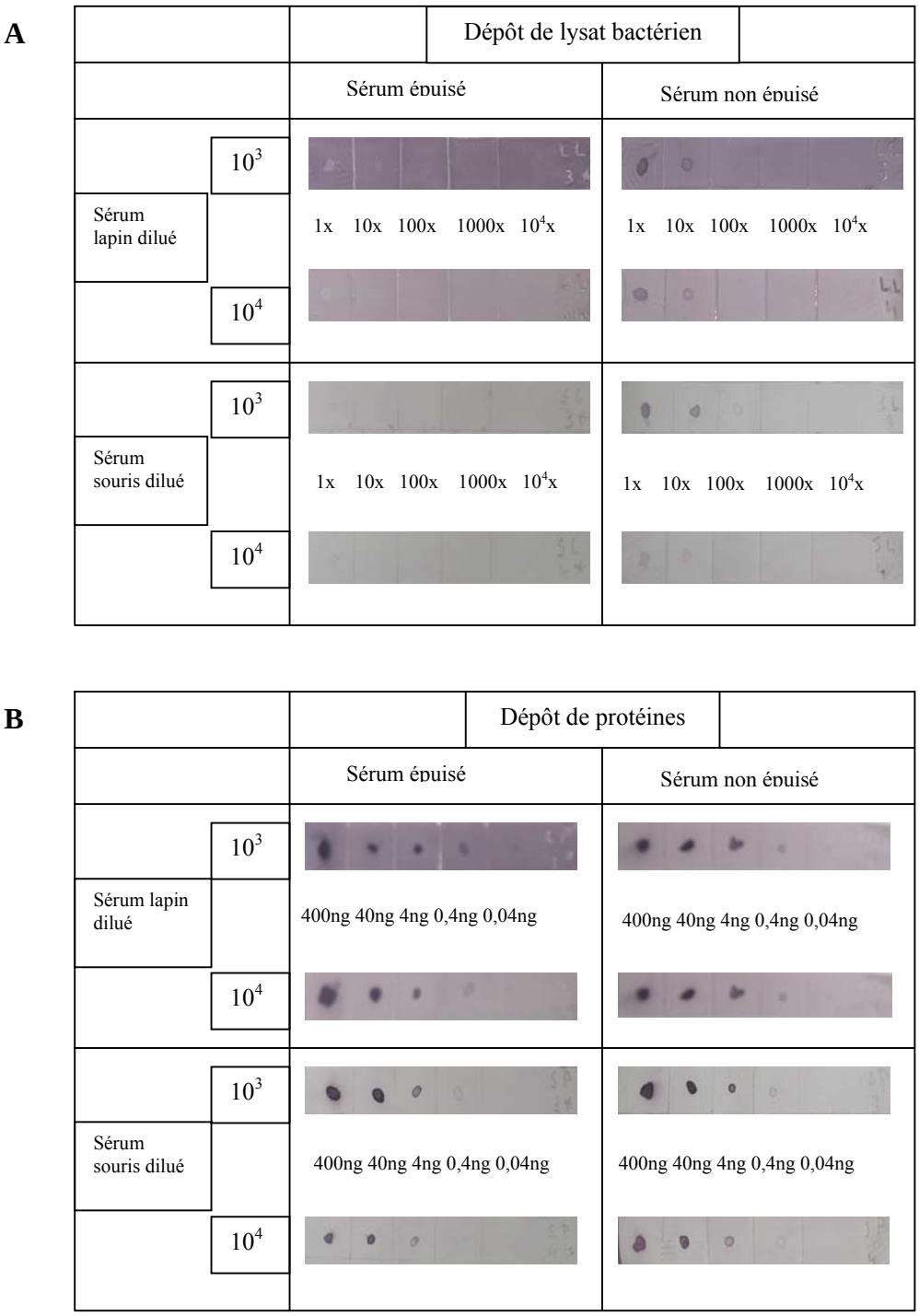


Figure 28 : test de spécificité des polysérum de souris et de lapin
A) test de l'efficacité de l'épuisement du sérum sur un dépôt de lysat bactérien.
B) le même test est réalisé sur un dépôt de protéines pariétales de racines de chicorée, il permet d'estimer la sensibilité du sérum de souris et de lapin avec et sans épuisement.

3.3 Caractérisation du sérum

La qualité d'une préparation d'anticorps aux fins de dosage ou d'identification repose sur sa spécificité. L'anticorps ne doit réagir que contre la ou les protéines d'intérêt pour éviter les réactions croisées avec d'autres protéines susceptibles de contaminer une préparation.

3.3.1 La technique du dot blot

La détection en dot blot est basée sur la reconnaissance d'un antigène d'intérêt, immobilisé sur un support solide, par des anticorps spécifiques (anticorps primaires), eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires permettant une détection en fluorescence, chémiluminescence ou colorimétrie.

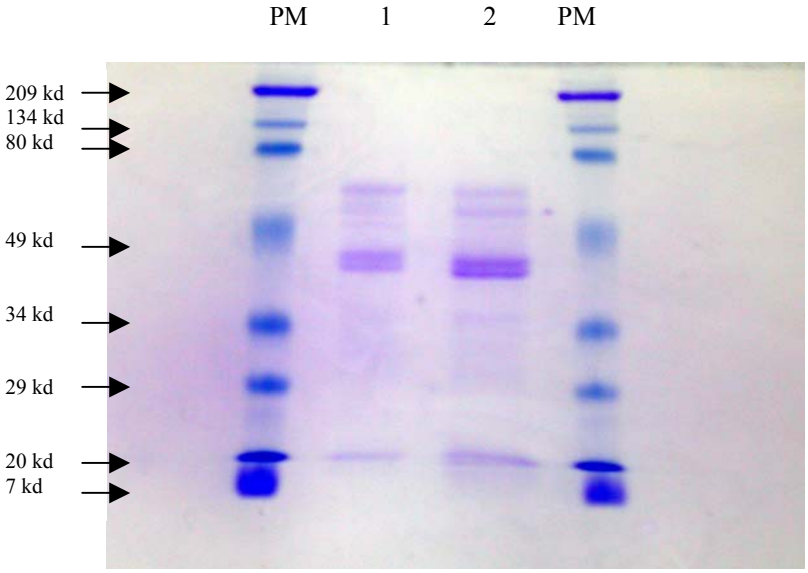
En pratique, 2 µl d'extrait de protéines pariétales (antigène) sont déposés sur des languettes de membrane de PVDF. Après une étape de saturation avec de la BSA ou de la poudre de lait, chacune des languettes est incubée en présence de polysérum anti-protéines pariétales (anticorps primaire). La visualisation de la fixation de l'anticorps primaire se fait par l'utilisation des anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline. Pour la révélation nous avons choisi une méthode colorimétrique.

La technique du dot blot a d'abord été utilisée pour caractériser le sérum, puis pour évaluer la méthode de détection utilisée lors du criblage. Le but était dans un premier temps de vérifier la sensibilité du sérum de souris et sa capacité à détecter spécifiquement des protéines pariétales. Ensuite, différents tests ont été menés pour identifier les meilleures conditions d'utilisation du sérum lors des criblages.

3.3.1.1 Seuil de détection du sérum et choix de sa dilution

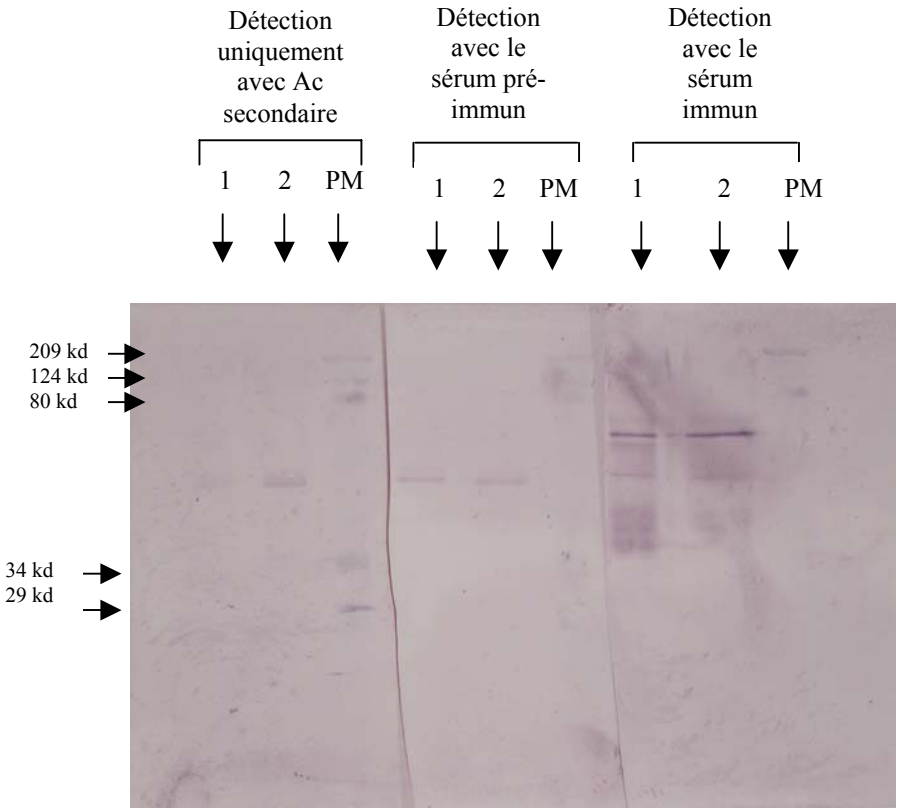
Les anticorps primaires dirigés contre les protéines pariétales ont été testés en dot blot contre des extraits protéiques de chicorée (ceux-là mêmes qui ont servi pour l'immunisation de la souris). Différentes dilutions (de 1X à 10^6X), de ces extraits sont déposés sur membrane de PVDF. Différentes dilutions de l'anticorps primaire ont été testées de manière à déterminer les conditions d'utilisation pour le criblage de la banque. Un contrôle a été réalisé en parallèle : l'anticorps secondaire est mis seul en présence des extraits pariétaux pour vérifier qu'il ne les reconnaît pas. Nous avons testé en même temps le sérum immun et le pré-immun (naïf) afin de vérifier l'efficacité de l'immunisation et pour déterminer la dilution efficace du sérum immum par rapport au pré-immun.

Dans des conditions de non épuisement du sérum, celui-ci est capable de détecter une quantité de protéines de l'ordre du nanogramme pour une dilution de 10^4 (figure 26). A partir de cette dilution, il devient difficile de faire une différence entre la détection avec le sérum pré-immun et le contrôle (qui pourrait être considéré comme une reconnaissance basale). Lorsque le sérum immun est dilué 10^4 fois il existe encore une reconnaissance des protéines tout à fait identifiable et nettement supérieure à celle du sérum pré-immun ou à celle du contrôle. Cette dilution peut être choisie pour les tests menés ultérieurement avec le sérum.



PM : poids moléculaire
1. extrait protéique de racine récoltée le 14/11/2002
2. extrait protéique de racine récoltée le 29/11/2002

Figure 29 : gel SDS PAGE 12% où ont migré deux extraits différents de protéines pariétales de chicorée (piste 1 et 2). Coloration au bleu de Coomassie.



PM : poids moléculaire
1. extrait protéique de racine récoltée le 14/11/2002
2. extrait protéique de racine récoltée le 29/11/2002

Figure 30 : western blot, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF. La membrane est ensuite incubée dans une solution de saturation puis avec un polysérum anti-protéines pariétale. La liaison des anticorps primaires sur les protéines est révélée grâce à un anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline.

3.3.1.2 Seuil de détection pour un sérum épuisé

Il est possible de tester la sensibilité du sérum dans les mêmes conditions que celles appliquées lors du criblage de la banque, c'est-à-dire avec un épuisement préalable de l'anticorps primaire (épuisement maximal = un volume d'anticorps dans un volume de lysat bactérien). Avant de cribler la banque, il est nécessaire d'épuiser le sérum de ses anticorps dirigés contre des protéines d'*E.coli*. Une souris produit naturellement des anticorps dirigés contre des protéines d'*E.coli*. Les plages de lyse contenant ce type de protéines pourraient être reconnues par un sérum même pré-immun. Il vaut donc mieux épuiser au préalable chaque sérum avec un lysat bactérien avant son utilisation. Ce lysat comme décrit dans « matériel et méthodes », est préparé au départ de cultures de bactéries XL1 blue MRF'.

Cet épuisement augmente la spécificité du criblage mais, comme observé sur la figure 27, elle ne diminue pas la sensibilité du sérum immun. Il y a une différence de reconnaissance plus marquée que dans le test précédent entre le sérum immun et pré-immun après leur épuisement respectif.

3.3.1.3 L'épuisement est-il nécessaire ?

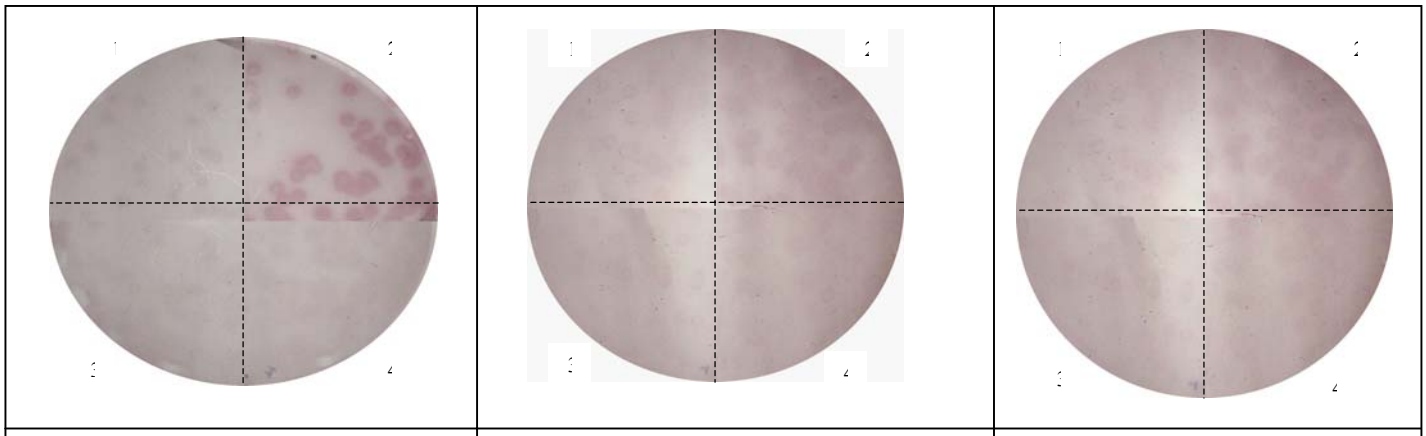
Pour tester la nécessité de l'épuisement, différentes dilutions de lysat bactérien sont déposées sur des languettes de PVDF. Deux dilutions sont testées pour le sérum épuisé et le sérum non épuisé. La méthode de révélation est identique à celle utilisée précédemment. On peut observer que pour le sérum non épuisé il existe une reconnaissance du lysat bactérien, contrairement au sérum épuisé. Cet épuisement est donc nécessaire afin d'éviter ultérieurement des réactions non spécifiques lors du criblage des plages de lyse (figure 28 A).

Un autre polysérum a été testé au cours de ce mémoire : il s'agit d'un sérum de lapin dirigé contre une peroxydase pariétale. Sa sensibilité est aussi estimée à 4 ng pour une dilution 10^4 fois et un épuisement maximal (figure 28 B). De nouveau, le fait d'épuiser ce sérum s'avère nécessaire pour éviter une reconnaissance non spécifique du lysat bactérien lors du criblage (figure 28 A).

3.3.2 Détection en Western blot

Avant de faire un Western blot, nous avons réalisé une migration de deux extraits différents de protéines de chicorée sur gel SDS-PAGE 12%. Suite à la coloration au bleu de Coomassie, il est possible d'observer deux profils fort semblables (figure 29). Deux bandes de forte intensité ressortent aux environs de 40 kDa, de même que trois autres bandes : deux entre 80 et 49kDa et une dans le bas du gel (20kDa). On peut comparer ces gels avec les résultats obtenus pour les profils de migration des estérases. Il est peu probable que ces bandes de fortes intensités correspondent à des estérases dont les PM sont estimé à 35, 50 et 65 kDa, ni à des PME (PM de plus de 75 kDa).

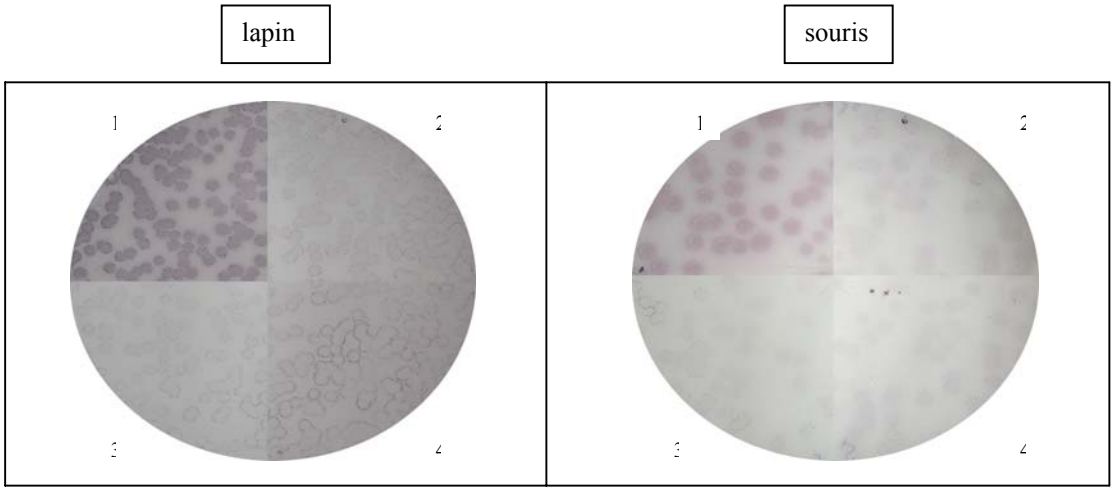
La méthode de détection utilisée lors du criblage de la banque a été évaluée en Western blot. Après migration en gel SDS PAGE, des échantillons de protéines pariétales sont transférés sur une membrane de PVDF et marqués avec le sérum de souris anti protéines pariétales. Deux contrôles sont réalisés en parallèle, le premier avec le sérum pré-immun et le second avec uniquement l'anticorps secondaire. Une bande entre 80 et 49 kDa est révélée pour les trois conditions (figure 30). Pour le sérum immun, il existe plusieurs bandes colorées dont une



Sous criblage du clone immunopositif	Criblage de la banque	Criblage d'un mélange banque et clone +

Différents épuisement
1. épuisement : volume Ac (BSA1%) + ½ volume lysat bactérien
2. épuisement : volume Ac (BSA1%) + 1 volume lysat bactérien
3. épuisement : volume Ac (BSA1%) + ¼ volume lysat bactérien
4. pas d'épuisement (pas de lysat bactérien)

Figure 31 : comparaison entre des criblages effectués, et ce pour différents épuisements du polysérum de souris :
A) sur des phages immunopositifs
B) sur des phages provenant de la banque (cDNA de racines de chicorée *Nausica*) (plages de lyse normalement négatifs)
C) sur un mélange phages issus de la banque (cDNA de racines de chicorée *Nausica*) et des phages immunopositifs



Différents épuisement
1. épuisement : volume Ac (BSA1%) + ½ volume lysat bactérien
2. épuisement : volume Ac (BSA1%) + 1 volume lysat bactérien
3. épuisement : volume Ac (BSA1%) + ¼ volume lysat bactérien
4. pas d'épuisement (pas de lysat bactérien)

Figure 32 : criblage effectué sur des phages de la banque λ Zap (cDNA de racines de chicorée *Nausica*), essai de différents épuisements de deux polysérum (un polysérum de lapin dirigé contre une peroxydase et un polysérum de souris dirigé contre des protéines pariétales).

clairement visible aux environs de 75 kDa (cette bande pourrait éventuellement correspondre à une PME). Les résultats obtenus en dot blot concernant la spécificité du sérum sont donc validés en Western blot.

Suite aux différentes expériences visant à éprouver le polysérum, nous avons déterminé qu'il était efficace pour une dilution de 10.000 fois, ce qui nous permettra de travailler avec des grands volumes lors du criblage. Sa spécificité a aussi été confirmée. Nous pouvions donc passer au criblage de la banque proprement dit.

3.4 Criblage d'une banque d'expression

Le criblage d'une banque d'ADNc consiste à sélectionner spécifiquement des clones bactériens contenant la séquence du gène recherché. La taille de la banque initiale qui sera criblée est estimée à 1,2 10^5 pfu/ml, la taille de la banque amplifiée étant quant à elle estimée à 4,4 10^8 pfu/ml. Pour rappel, la banque d'ADNc a été construite dans le vecteur d'expression UNI-ZAP XR : le site d'insertion de l'ADNc se trouve en aval d'un promoteur (plac). Le clonage est directionnel et se fait dans le MCS suite à la liaison d'adaptateur EcoRI et XhoI sur l'insert.

Afin d'identifier les clones d'intérêt, une réplique de la banque est réalisée. Les plages de lyse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (membrane d'hybridation) qui est imbibée d'IPTG. Suite à l'induction à l'IPTG du promoteur plac, toutes les bactéries contenant les vecteurs recombinants sont capables de synthétiser la protéine correspondant à l'ADNc inséré (au problème de phase près). Après l'empreinte, ces membranes sont incubées avec l'anticorps dirigé contre les protéines dont on souhaite cloner l'ADNc (ici, ce sont des ADNc codant pour des protéines pariétales de chicorée). Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé par une réaction colorimétrique à l'aide du deuxième anticorps couplé à la phosphatase alcaline. Les clones répondant à cette hybridation sont alors repérés sur la boîte de Pétri et prélevés.

Différentes conditions de criblage ont été testées. Dans un premier temps nous avions repris le protocole de JM Schaus qui avait permis l'isolement d'un clone codant pour une sucrose synthase. 300 µl de bactéries XL1 blue MRF' à une DO_{600} de 0,5 ont été infectées avec 8400 pfu de la banque amplifiée (dont le titre était de 4,4 10^8 pfu/ml). Afin d'être représentatif de la banque initiale dont le titre est de 1,2 10^5 pfu/ml, nous avons travaillé avec 15 boîtes. L'infection se déroulait à 42°C et, quand les plages de lyse atteignaient la taille d'une tête d'épingle (après 5h), une empreinte était réalisée par dépôt sur la boîte de culture d'une membrane de nitrocellulose pré-incubée dans une solution d'IPTG. Après 4 heures à 37°C, les membranes étaient retirées en vue de procéder au marquage. Celui-ci se déroulait comme lors des dot blots, après épuisement préalable de polysérum.

Lors de ce premier test, aucune coloration n'est apparue après révélation. Un second test, effectué sur quatre membranes, a mis en évidence une plage de lyse (résultat non présenté). Celle-ci a été prélevée et amplifiée dans du milieu SM. Désormais, ce clone isolé sera appelé le clone positif, son séquençage et sa caractérisation seront présentés ultérieurement.

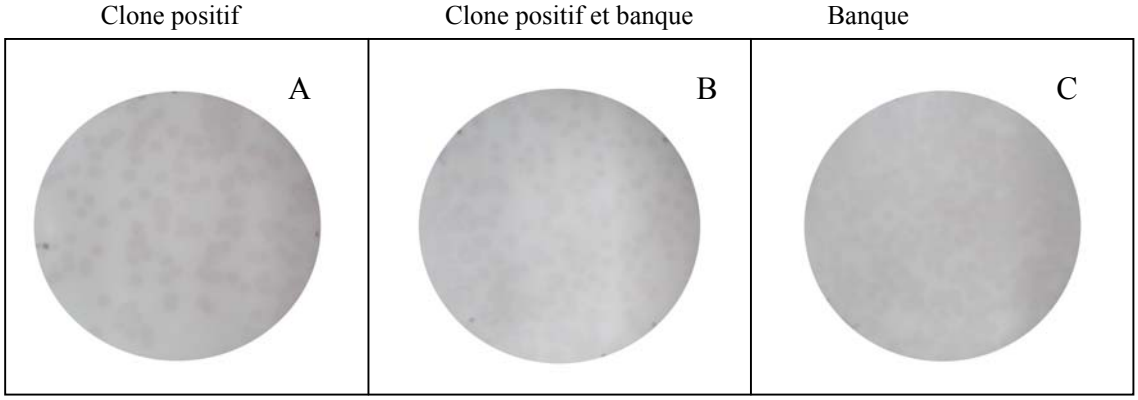


Figure 33 : dans de nouvelles condition de criblage (tampon de plus forte molarité, saturation à la BSA 3% et épuisement dans uniquement du lysat batérien) comparaison des criblages effectués sur :

A) sur des phages immunopositifs
B) sur un mélange de phages issus de la banque (cDNA de racines de chicorée *Nausica*) et de phages immunopositifs
C) sur des phages de la banque d'expression fabriquée au départ de cDNA de racines de chicorée *Nausica* (plages de lyse normalement négatives).

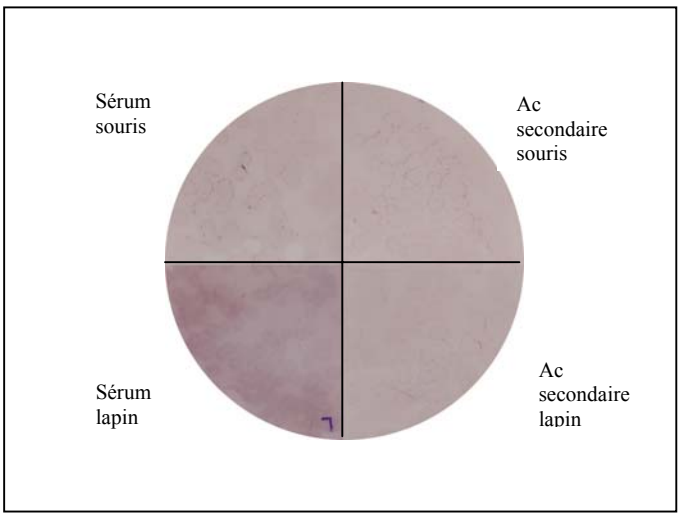


Figure 34 : test des deux types d'anticorps secondaires utilisés (anti IgG de lapin et anti IgG de souris) contre la banque λ Zap (de racines de chicorée *Nausica*) et comparaison avec les conditions de révélation normale.

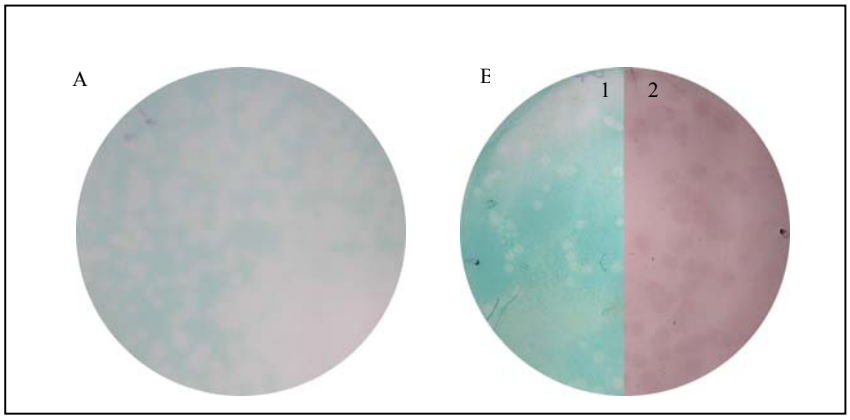


Figure 35 : test d'un autre système de révélation, avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (horse radish peroxydase)

A) contre la banque λ Zap (cDNA de racines de chicorée *Nausica*)
B) contre le phage immunopositif (1) et comparaison avec le système de révélation à la phosphatase alcaline (2).

Lors du deuxième tour de criblage sur ce clone positif, rien n'a été révélé sur la membrane de nitrocellulose. Au vu du manque de résultats, nous nous sommes alors posé la question de savoir si le protocole de criblage était adéquat. Différents changements ont été apportés, tout d'abord le nombre de plages de lyse par boîte a été optimisé et les conditions d'infection ont été changées. Le sérum a subi différents tests visant à déterminer si les conditions d'épuisement étaient bonnes, et un autre polysérum témoin a été testé sur la banque. Les tampons utilisés lors de la phase de marquage des empreintes et lors de leur saturation ont été améliorés. La vérification de l'absence d'artéfact dû à l'anticorps secondaire a aussi été effectuée contre la banque.

Ainsi, le nombre de pfu par boîte a été optimisé tout en évitant la confluence des plages de lyse. Le nombre de pfu optimal se situe aux alentours de 1500 pfu/boîte. La durée d'incubation a été portée à une nuit, à 37°C, lors de la phase d'infection. Enfin, différents épuisements ont été testés pour l'anticorps primaire.

Après adaptation du protocole, toutes les plages de lyse sont reconnues (bien qu'assez faiblement pour l'épuisement maximal de l'anticorps), tant au niveau de la banque, que du clone positif ou encore lorsque la banque et le clone positif sont mélangés. Sur les photos présentées (figure 31) cette reconnaissance est assez difficile à mettre en évidence, notamment à cause de la qualité d'impression. Le fait de changer les conditions d'épuisement n'influence pas la reconnaissance puisque, pour l'épuisement maximal (un volume Ac pour un volume de lysat) ou pour un sérum non épuisé, toutes les plages de lyse sont colorées. Remarquons aussi que le clone positif ne se distingue pas des clones négatifs de la banque lorsqu'ils sont mélangés.

Pour remédier à ce problème de spécificité du sérum, plusieurs protocoles ont été envisagés. Dans le but de diminuer les liaisons non spécifiques, on a augmenté les concentrations en sels dans les tampons utilisés notamment lors des lavages. La saturation des membranes a été faite avec de la BSA 3% plutôt qu'avec de la poudre de lait 5%. Un autre sérum a été testé en parallèle à celui de souris. Ce polysérum a été mis au point chez un lapin et permet l'identification d'une peroxydase de cal de betterave. Le protocole de criblage qui avait mené à cette conclusion était identique à celui utilisé ici.

Malgré l'adaptation du protocole expérimental, toutes les plages de lyse sont identifiables suite à la réaction colorimétrique et ce, aussi bien avec le sérum de lapin qu'avec le sérum de souris (figure 32). De nouveau la reconnaissance est plus faible lorsque le sérum est fortement épuisé (figure 32.1).

Désireux de pouvoir réellement faire la différence entre la reconnaissance de la banque et celle du clone, un dernier protocole a été testé. Cette fois l'anticorps primaire a été épuisé une nuit dans du lysat bactérien uniquement. Le sérum ainsi épuisé a été testé contre la banque, contre le clone positif et contre un mélange banque et clone positif. La reconnaissance du clone positif semble plus forte que celle de la banque ou du mélange banque-clone positif. Mais de nouveau toutes les plages de lyse sont colorées suite au marquage (figure 33).

Deux questions se posent donc :

La reconnaissance généralisée n'est-elle pas due à l'anticorps secondaire qui reconnaîtrait les protéines bactériennes autour des plages de lyse ? Nous avons cependant testé les deux types

d'anticorps secondaires utilisés (anti IgG de souris et anti IgG de lapin) contre la banque, et rien n'a été révélé suite à la coloration avec le NBT-BCIP (figure 34).

Le système de révélation est-il efficace? Un essai de révélation du criblage avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (HRP : horse radish peroxydase) dilué 500 fois a été réalisé. Rien n'a été révélé pas même le clone positif. La coloration à la phosphatase alcaline avec comme substrat le NBT-BCIP semble donc plus sensible (figure 35).

Conclusion

Différentes hypothèses peuvent être émises suite aux résultats obtenus :

Soit le clone est positif, et il possède un ou des épitopes reconnus par certains anticorps du polysérum. Il code donc pour une protéine ayant été isolée par le traitement salin que les racines de chicorée ont subi et qui a servi à l'immunisation de la souris. On peut alors espérer avoir isolé une séquence codant pour des protéines pariétales ou encore pour des protéines membranaires qui sont en contact intime avec la matrice extracellulaire.

Soit le clone est un faux positif, il peut être un artéfact.

Les résultats obtenus ne permettent pas de trancher entre les deux hypothèses proposées. Lors des tests effectués, le clone étalé seul sur une boîte de Pétri et révélé avec l'anticorps primaire anti-protéines pariétales et l'anti IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline avait une coloration plus forte que la banque. Cet argument va dans le sens d'un clone réellement positif. Toutefois, lorsque les phages de la banque (supposés négatifs) et le phage positif sont mélangés, il est impossible de faire la différence entre les plages positives et négatives car elles avaient toutes la même intensité de coloration suite à la révélation.

Bien qu'il soit difficile d'affirmer avec certitude que le clone isolé lors des premiers criblages soit positif, nous avons décidé d'aller plus avant dans sa caractérisation et, notamment, de le séquencer.

3.5 Caractérisation et séquençage du clone positif issu du criblage

3.5.1 Séquençage du clone

3.5.1.1 Procédure d'excision du pBluescript

Pour rappel, la banque d'expression a été construite dans des phages λ-ZAP. Ces derniers contiennent un vecteur de type phagemide (UNI-ZAP XR) englobant toute la séquence du vecteur pBluescript au niveau duquel sont clonés les ADNc dérivés des ARNm de chicorée. Ce vecteur pBluescript est mieux adapté pour les manipulations ultérieures, notamment le séquençage. Il peut être excisé du phagemide grâce à un phage helper. En résumé, des

bactéries XL1 bleu MRF' sont co-infectées avec les phages λ-ZAP provenant d'une plage de lyse d'intérêt et avec un phage helper qui code pour les protéines qui vont exciser le vecteur pBluescript. Celui-ci est re-circularisé dans les bactéries et les particules de phage helper l'ayant intégré sont produites dans le milieu de culture. Les bactéries utilisées pour ce processus d'excision sont tuées par chauffage à 65-70°C et enlevées du milieu de culture par centrifugation. Le surnageant contenant les phages est ensuite mélangé avec d'autres *E. coli* (SOLR) qui, après infection, sont étalées sur du milieu en présence d'un antibiotique permettant de sélectionner les bactéries transformées par le vecteur. Dans les bactéries SOLR, il n'y a pas de co-infection ; ces souches contrairement au XL1 blue MRF' sont non suppressives. Le phage helper, contenant un codon stop (AMBRE) dans sa séquence, est incapable de se répliquer dans les souches non suppressives.

Après cette étape d'excision « *in vivo* » effectuée au départ d'une plage de lyse issue du criblage, la présence d'un insert a été vérifiée dans les colonies de bactéries SOLR. Une PCR a été réalisée sur ces colonies en utilisant les amorces universelles situées de part et d'autre de l'insert dans le vecteur pBluescript. Les séquences des amorces sont les suivantes :

FwM13 pBs : 5' GTA AAA CGA CGG CCA GTG 3'

RvM13 pBs : 5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA 3'

L'analyse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus a montré la présence d'amplicons d'une taille de 2000 pb dans les cinq colonies prises au hasard (figure 36). Les produits PCR correspondant à deux de ces colonies ont été purifiés et les extrémités 5' et 3' des inserts ont été séquencées à l'aide des amorces universelles FwM13 pBs et RvM13 pBs. Le séquençage sur le produit PCR n'étant pas très concluant, nous avons réalisé une mini-prep dans le but d'isoler les vecteurs et puis de recommencer le séquençage sur ceux-ci avec les amorces universelles.

3.5.1.2 Séquençage du clone

L'ADNc de ce clone a été entièrement séquencé dans les deux sens (5'→ 3' et 3'→ 5') en utilisant en plus des amorces universelles, des amorces internes (6 amorces différentes : A, B, C, D, E, F) définies progressivement au cours du séquençage (figure 37). Les différents morceaux issus du séquençage ont été réunis en un contig (grâce au programme Vector NTI) et les endroits litigieux ont été vérifiés au départ des profils électrophorétiques pour arriver à une séquence de 2295 pb, ce qui correspond assez bien à la taille estimée de l'insert sur gel d'agarose.

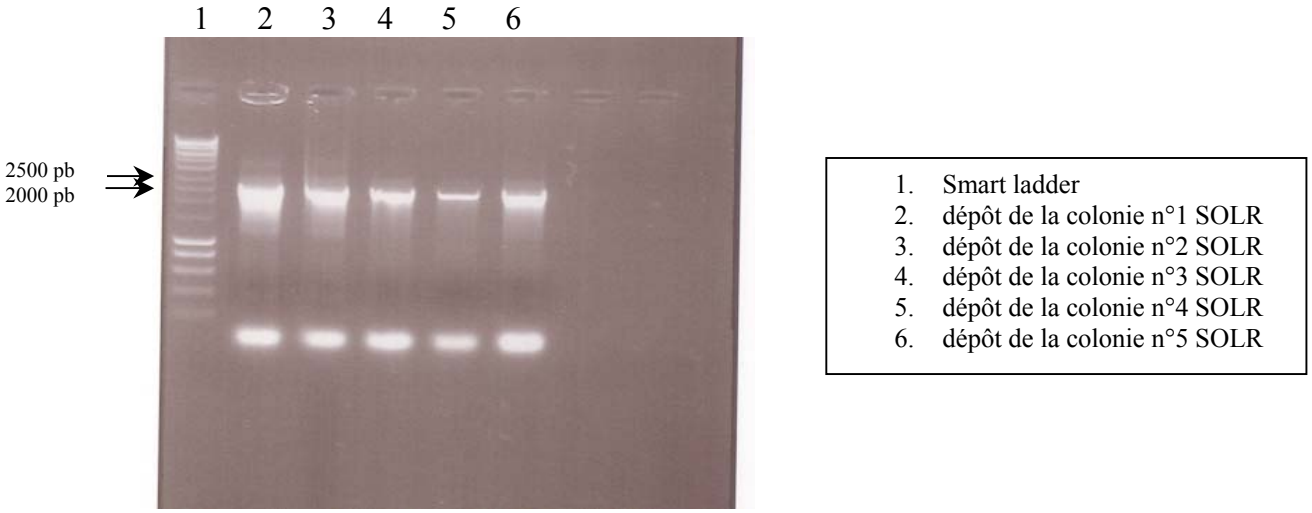


Figure 36 : analyse sur gel d'agarose des produits PCR réalisés au départ de 5 colonies de bactéries SOLR, contenant le vecteur pBluescript avec l'insert d'intérêt.

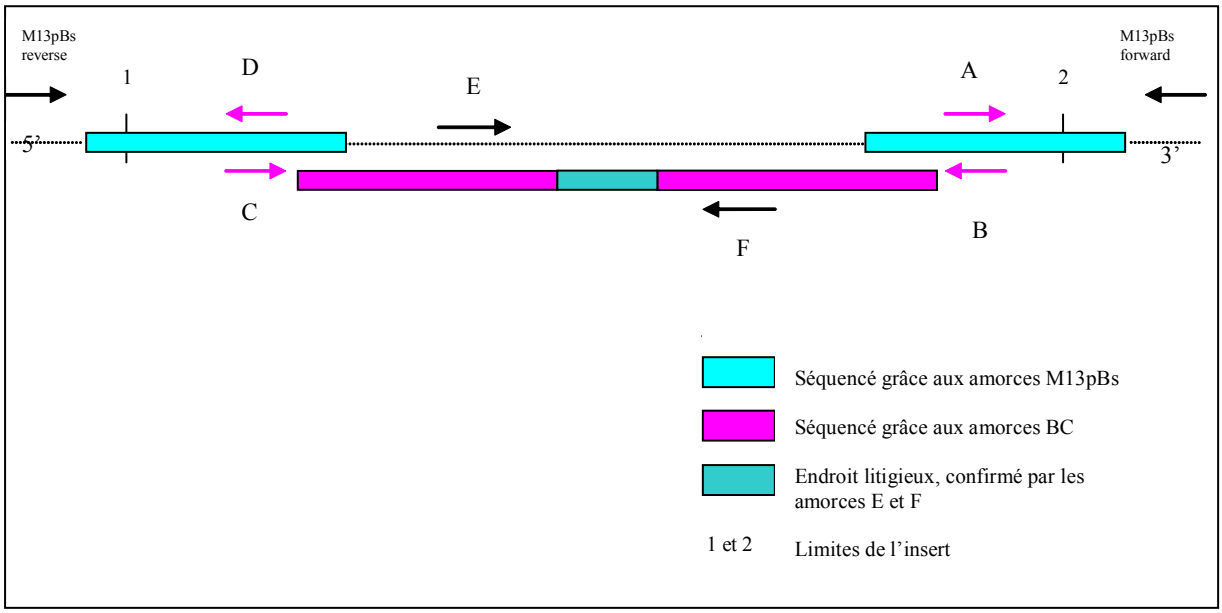


Figure 37 : représentation schématique des différentes étapes ayant permis d'arriver à la séquence complète du clone positif.

3.5.2 Concept de pseudogène

3.5.2.1 Analyse de la séquence

Grâce au programme « Vector NTI », la traduction dans les trois phases de lecture de la séquence nucléotidique a été effectuée (seules les phases +1, +2 et +3 sont réalisées car l'insertion de l'ADNc dans le vecteur pBluescript est directionnelle). On peut constater sur la figure 38 qu'il existe de nombreux codons stop dans les 3 phases de lecture. Pour chaque méthionine identifiée, il existe endéans les 10 aa un codon stop. La seule exception concerne la phase de lecture +1, entre les aa 198 et 611 où il n'y a pas un tel codon. Il est dès lors probable que cette phase corresponde au cadre de lecture. Sur les 413 aa (soit 1239 nucléotides) où il n'y pas de codon stop, la première méthionine (codon start) est plus loin dans la séquence, soit à l'aa 523. La taille estimée d'une telle protéine est de 27,5 kDa si on commence au codon start (aa 523). En amont de cette séquence ininterrompue de 413 aa, plus de 15 codons stop sont identifiables et ont été confirmés suite à l'analyse des profils électrophorétiques. Nous avons émis l'hypothèse que nous avions affaire à un pseudogène, c'est-à-dire à une séquence d'ADN très similaire à d'autre gènes mais interrompue par un ou plusieurs codons stop.

Voir annexe mémoire M.-C. Delescaille 2

3.5.2.2 Définition des pseudogènes

Les pseudogènes sont des séquences d'ADN similaires aux gènes normaux mais non fonctionnels. Ils sont considérés comme des « parents défunts » des gènes fonctionnels. Ils peuvent se former de deux manières :

- par duplication : des modifications (mutations, inversion, délétion ou encore des changements dans le cadre de lecture) de la séquence d'ADN d'un gène peuvent se dérouler durant la duplication. Ces réarrangements peuvent aboutir à la perte de fonction d'un gène à un niveau transcriptionnel ou traductionnel, puisque la séquence ne résulte pas dans la production d'une protéine. Les copies des gènes ainsi modifiés sont appelées pseudogènes dupliqués ou non « processés ».

- par rétrotransposition : suite à la transcription reverse d'un ARNm, il y a une réintégration ultérieure de l'ADNc dans le génome. De telles copies sont appelées pseudogènes processés. Ces pseudogènes peuvent aussi accumuler des mutations aléatoires au cours de temps.

Suite à sa rétrotransposition, il est peu probable qu'un pseudogène s'intègre dans le génome derrière un promoteur. Sachant que la séquence a été isolée au départ d'un criblage immunologique, il y a donc eu production d'un transcrit et ensuite d'un peptide ayant permis l'identification grâce au polysérum. Pour qu'il y ait transcription d'un gène, celui-ci doit être en aval d'un promoteur et il est donc plus plausible que nous soyons en présence d'un pseudogène dupliqué.

L'étude des pseudogènes est intéressante car ils fournissent une trace de la manière dont l'ADN génomique a changé sans pression de l'évolution. Ils peuvent donc être utilisés comme modèle pour déterminer les taux de substitution, d'insertion et de délétion dans un génome.

3.5.3 Détection d'un pseudogène grâce à un polysérum

Suite aux mutations intervenues dans la séquence, il y a perte de fonction d'un gène à un niveau transcriptionnel ou traductionnel et donc, il n'y a normalement pas production de protéines.

3.5.3.1 La transcription des pseudogènes

Il est possible d'isoler des pseudogènes suite à un clonage moléculaire (Min et *al*., 2000). Ces auteurs avaient identifiés des pseudogènes grâce à des amorces nucléotidiques choisies pour cribler des séquences d'aldéhyde oxydase chez la tomate. La banque d'ADNc criblée avait été construite par un procédé identique à celui utilisé pour fabriquer notre banque d'ADNc de chicorée. Ceci prouve que les pseudogènes peuvent être transcrits puisqu'ils ont pu être isolés d'une banque d'ADNc.

3.5.3.2 La traduction du pseudogène

Comment expliquer qu'une séquence interrompue par de multiples codons STOP puisse être traduite en protéine et détectée par des anticorps lors du criblage immunologique ? Il existe trois types de codon stop : le codon AMBRE correspondant à la séquence TAG, le codon OPALE correspondant à la séquence TGA et le codon OCRE qui est, lui, encodé par la séquence TAA. Lors du criblage, nous avons utilisé une souche de bactéries particulières (XL1 blue MRF') pouvant être infectée par des phages. Cette souche est suppressive, elle ne reconnaît pas le codon AMBRE comme tel. Ce système était intéressant car il permettait la co-infection des bactéries par un phage d'intérêt et le phage helper qui permet l'excision du pBluescript grâce aux protéines qu'il encode. Le codon AMBRE situé en position 14 n'a donc pas interrompu la traduction du l'ARNm.

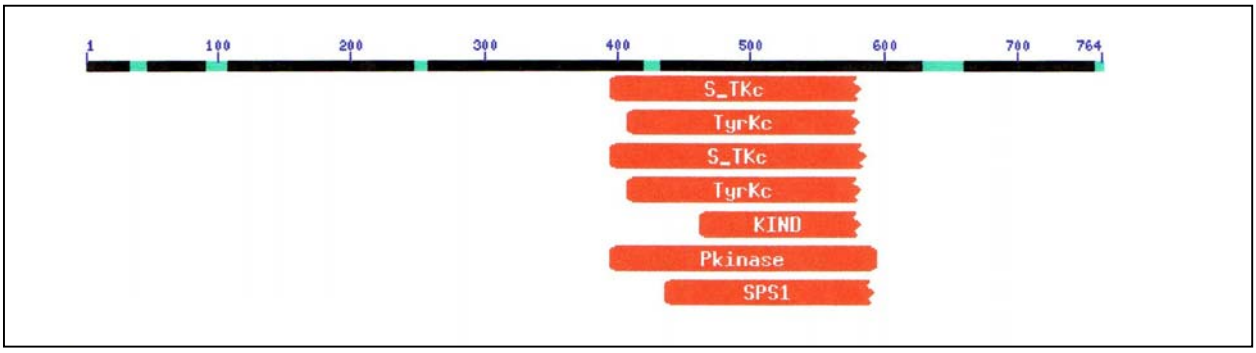


Figure 39 : représentation schématique de domaines identifiés par le programme BlastP sur la traduction du pseudogène dans la phase de lecture 1. La séquence comparée est comprise entre le site de restriction EcoRI et le polyA.

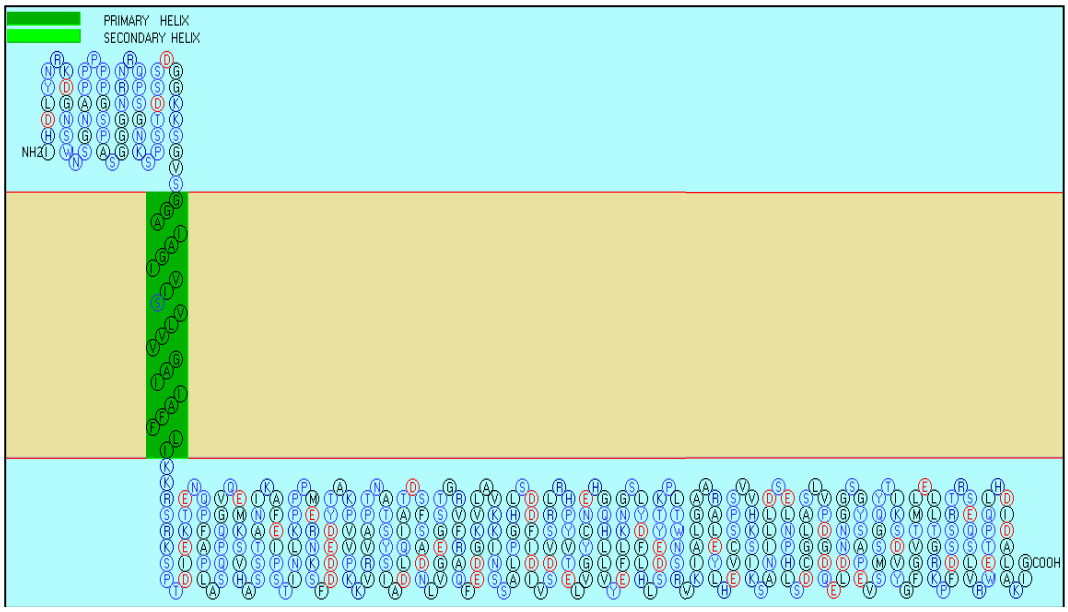


Figure 40 : représentation obtenue grâce au programme SOSUI de la séquence de 413 acides aminés non interrompue par des codons stop (dans la phase de traduction +1).

Si l'on tient compte des caractéristiques de la souche utilisée et que l'on analyse la séquence en acides aminés dans la phase +1, on peut en déduire qu'il y aura traduction d'un peptide de 34 acides aminés. La première méthionine se situe en position 11, elle n'est pas dans un contexte optimal permettant la traduction c'est-à-dire un C en -3 et un G en +4 (Ding et *al.*, 2004). Le codon stop qui la suit de près est un codon AMBRE qui ne sera donc pas traduit comme tel. La fin de la traduction se fera au niveau du codon OCRE en position 45.

3.5.3.3 Détection grâce au polysérum

Si l'on admet que le clone isolé lors du criblage était réellement un clone positif, le peptide traduit dans les souches de XL1 blue MRF' doit avoir un motif reconnu par un anticorps présent dans le polysérum dirigé contre des protéines pariétales de chicorée. Le motif ne fait que 34 acides aminés, ce qui est assez court. Aucune homologie de ce peptide avec une quelconque séquence des banques de données n'a pu être détectée par BLAST. Il doit toutefois exister une protéine pariétale ou à tout le moins transmembranaire chez *C. intybus* qui partage une identité suffisante avec ce peptide de 34 aa, pour autant que l'on admette que notre clone n'est pas un faux positif.

Différents programmes informatiques ont été utilisés pour identifier à quel gène le pseudogène est apparenté et quelle est la fonction. Cette fonction putative permettrait de savoir si le motif identifié appartient à une protéine ayant servi à l'immunisation de la souris (bien qu'il soit difficile de savoir ce qui a été inoculé à la souris, des tests du sérum contre des protéines typiquement pariétales n'ayant pas été réalisés).

3.5.4 Fonction potentielle de gènes apparentés au pseudogène

L'analyse de Blast X de la séquence nucléotidique obtenue (c'est-à-dire la traduction de cette séquence dans les 6 phases de lecture et la comparaison des séquences protéiques obtenues avec des séquences protéiques disponibles dans la banque de données) a permis d'identifier une éventuelle homologie de séquence et une première déduction de la fonction.

numéro d'accession	fonction putative et protéines montrant une homologie	E value
AAQ89622.1	At1g53730 [Arabidopsis thaliana]	e-115
AAC27894.1	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase 1 (Zea mays)	e-111
BAB01040.1	serine/threonine protein kinase-like protein [Arabidopsis thaliana]	e-110
NP_974311.1	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative (AT)	e-110
AAO72637.1	putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase (riz)	e-107

Table 2 : tableau reprenant les cinq meilleurs résultats obtenus dans Genebank grâce au programme BlastX.

Dans ce tableau sont représentées les cinq séquences identifiées en BlastX ayant la plus grande E value. Une fonction putative revient systématiquement. Il s'agit d'une protéine kinase ayant un domaine transmembranaire et un domaine riche en leucine (le gène At1g53730 a aussi comme domaine putatif un domaine leucine associé à un domaine kinase).

Dans les alignements de séquence, la phase de traduction +1 de la protéine d'intérêt est le plus souvent alignée. Cette constatation renforce l'idée que cette phase est probablement celle du cadre ouvert de lecture. Remarquons que la séquence AAC27894 totalise 2041 nucléotides, ce qui correspond à 680 aa, soit une protéine dont la masse est estimée à 75,5 kDa ce qui est nettement supérieur à l'estimation de la masse de notre peptide partiel correspondant à la phase ouverte de lecture (27,5 kDa).

Quelques conclusions peuvent être tirées de cette première analyse. Les gènes apparentés au clone isolé suite au criblage semblent coder pour un récepteur transmembranaire possédant un domaine riche en leucine et un domaine kinase. Il est difficile de dire si ce type de récepteur est en contact avec les polysaccharides pariétaux et s'il a pu être isolé dans les extraits protéiques inoculés à la souris. Rappelons que nous ignorons toujours si ce clone a été réellement détecté grâce au polysérum ou s'il était juste un artéfact et donc un clone négatif.

3.5.4.1 Analyse sur la séquence peptidique en phase +1

Blast P

Nous avons procédé à diverses analyses sur la séquence protéique de la phase +1, à commencer par un BlastP (ce programme permet la comparaison de séquences protéiques avec celles disponibles dans la banque de données ainsi que la détermination d'éventuels sous- domaines dans la séquence).

numéro d'accession	fonction de la séquence alignée	E value

cd00180	serine/threonine protein kinases, catalytic domain	e-34
cd00192	Tyrosine kinase, catalytic domain	e-28
smart00220	serine/threonine protein kinases, catalytic domain	e-33
smart00219	Tyrosine kinase, catalytic domain	e-28
smart00750	KIND, kinase non catalytic C-lobe domain	e-03
pfam00069	Pkinase, protein kinase domain	e-37
COG0515	SPS1, serine/threonine kinase	e-17

Table 3 : sept résultats obtenus avec le programme BlastP sur la séquence d'intérêt dans la phase de lecture +1

Dans ce tableau 3 sont présentés les résultats obtenus en BlastP lorsqu'on y introduit la séquence en acides aminés dans la phase +1. La séquence introduite a été traduite à partir du site de restriction EcoRI jusqu'au site du polyA. Entre les acides aminés 400 et 600 (c'est-à-dire du côté C terminal de la protéine), il semble y avoir reconnaissance d'un domaine catalytique de kinase et ce avec une bonne E value (figure 39). Du côté N terminal, aucun domaine ne semble avoir été identifié, pas même un domaine LRR qui, s'il existe, pourrait se trouver de ce côté de la protéine.

Sites de prédiction de séquences transmembranaires

Nous avons utilisé deux programmes du site *bioinformatics.vg* pour déterminer s'il existait des domaines transmembranaires, plus particulièrement dans la séquence en acides aminés non interrompue par des codons stop (c'est-à-dire de l'aa 199 au 612 dans la phase de lecture 1).

Le site TMpred permet la prédiction de régions traversant la membrane ainsi que leur orientation (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). L'algorithme est basé sur une analyse statistique de TMbase, une banque de données reprenant différentes protéines transmembranaires connues. La prédiction est faite en utilisant une combinaison de plusieurs matrices. Nous obtenons comme prédiction pour notre séquence de 413 aa, l'existence d'une hélice transmembranaire entre les acides aminés 61 et 80 dont l'orientation probable est de l'extérieur vers l'intérieur. Deux modèles alternatifs pour la structure de la protéine sont proposés : celui obtenant le meilleur score est celui où l'extrémité N terminale de la protéine se trouve en extra-cellulaire. Ce programme fournit aussi un profil d'hydropathie.

Le site SOSUI (http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html), donne un profil d'hydropathie simplifié, un diagramme reprenant les principales régions hydrophobes. Un domaine transmembranaire est de nouveau prédit entre les acides aminés 58 et 80. Ce site donne aussi une représentation schématique de la protéine (figure 40).

Sites de prédiction plus généraux

D'autres sites ont été utilisés. Ceux-ci on l'avantage de faire de la prédiction de domaines au départ de plusieurs programmes existants, chacun ayant sa spécificité. Par exemple, le site PlantsP (http://plantsp.genomics.purdue.edu/) permet de faire la prédiction de plusieurs sous-domaines dans la séquence. Un domaine transmembranaire potentiel est de nouveau identifié entre les acides aminés 61 et 80, de même qu'un domaine catalytique de kinase.

Le programme Prosite (http://us.expasy.org/prosite/), disponible au départ du serveur ExPasy proteomics permet d'identifier la famille d'une protéine et ses différents domaines.

3.5.4.2 Recherche de gènes apparentés dans des banques EST

Afin d'identifier le gène auquel notre pseudogène ressemble le plus, nous l'avons comparé avec la banque de données EST 3' de chicorée produite par le laboratoire. Quatre clones montrent un certain pourcentage d'homologie avec le notre. Il s'agit des EST : RSN004G09 (E value : 2-28), RNL004E10 (E value : 2-73), RBL003CO7 (E value : 1-78), RGN003A05 (E value : 1-57). Ce dernier a retenu notre attention car il est disponible physiquement au laboratoire et possède une bonne E value. Le clone RGN003A05 est issu de la banque Rg qui a été construite à partir d'ARNm extrait de racine de chicorée (variété *Arancha*) prélevée le 07/10/2002 à Grand-Manil. Les ARN messagers une fois extraits ont été rétrotranscrits en ADNc qui eux-mêmes ont été insérés dans un vecteur λ ZAP. Le titre de cette banque est estimée à 346.000 clones. Sur les neuf banques disponibles au laboratoire, 9000 clones ont été séquencés.

Suite au bon pourcentage d'homologie obtenu lors de l'alignement de l'extrémité 3' de notre clone avec le clone RGN003A05, nous avons décidé de poursuivre le séquençage de ce dernier. Les bactéries contenant l'insert RGN003A05 ont été mises en culture dans un milieu LB avec de l'ampicilline, puis une mini-prep a été réalisée afin d'extraire le vecteur pour son séquençage. Une PCR avec les amorces universelles forward et reverse M13pBs a été effectuée pour confirmer la présence de l'insert et donner une première estimation de sa taille sur gel d'agarose (figure 41).

L'insert a une taille proche de 2000 pb. Après le séquençage de ses extrémités, nous avons procédé à un alignement entre la séquence nucléotidique de notre clone d'intérêt et celles des extrémités 3' et 5' du clone RGN003A05. Pour l'extrémité 3' nous obtenons un pourcentage d'homologie de 50,7% et pour l'extrémité 5' le pourcentage est de 44,5% (résultats non présentés).

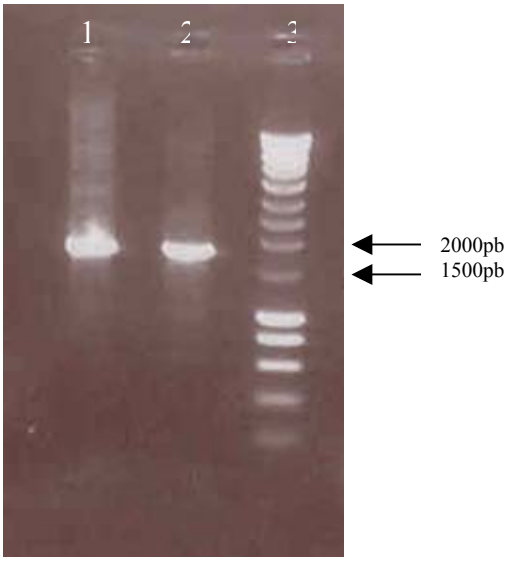
Nous avons ensuite procédé à un Blast X sur ces extrémités mises bout à bout. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (table 4 et figure 42).

n° d'accession	fonction putative des protéines montrant une homologie	E value
AAV44123.1	unknown protein (Oryza sativa)	1,00E-50
NP_180094.2	protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana]	8,00E-50
NP_194928.3	protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana]	1,00E-48
CAC03450.1	ser/thr specific protein kinase-like protein (Arabidopsis)	1,00E-46
CAB96857.1	ser/thr specific protein kinase-like protein (Arabidopsis)	1,00E-46

Table 4 : cinq meilleurs résultats obtenus dans Genebank avec le programme BlastX sur les extrémités du clone RGN003A05 mises bout à bout.

Les extrémités de la séquence montrent une homologie avec des protéines dont la fonction putative est une activité kinase et ce, avec une bonne E value. Remarquons que lors du BLASTX, du côté 3'du clone RGN003A05 nous obtenons une homologie avec une protéine de la famille des kinases d'*Arabidopsis thaliana* avec une bonne E value (1-50), tandis que du côté 5' il y a peu d'homologie, le meilleur résultat étant une homologie avec une protéine kinase avec une E value de 0,3. Cette conservation du domaine kinase cytoplasmique est

normale, de même que l'absence de conservation du domaine extracellulaire putatif de liaison à un ligand.



1. Produit PCR réalisé sur la mini prep 1 du clone RGN003A05
2. Produit PCR réalisé sur la mini prep 2 du clone RGN003A05
3. Smart Ladder

Figure 41 : vérification sur gel d'agarose 1% du produit d'amplification de l'insert du clone RGN003A05 et estimation de sa taille (2000 pb).

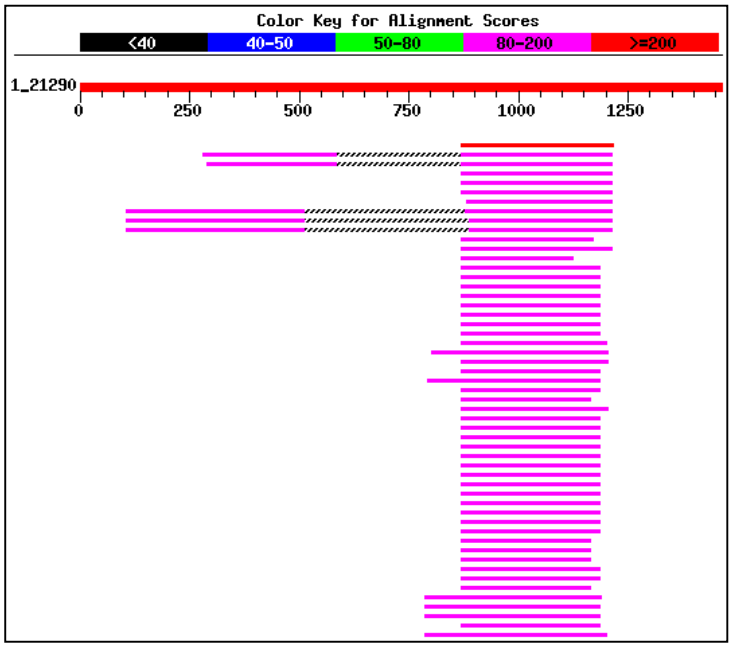


Figure 42 : représentation schématique des zones d'homologies obtenue en BlastX sur les extrémités du clone RGN003A05 mises bout à bout. On estime suite à la comparaison des extrémités du clone RGN003A05 avec notre clone d'intérêt qu'il ne manque qu'une vingtaine de nucléotides au clone RGN003A05 pour être totalement séquencé.

3.6 Conclusions

Chez les végétaux, plus de 3% du génome code pour des enzymes associées à la paroi, ce qui est nettement plus que chez d'autres organismes (chez *Saccharomyces cerevisiae* moins de 1,4%). Chez *Arabidopsis thaliana*, plus de 730 gènes codant pour des glycosides hydrolases et des glycosyltransférases, environ 60 PME, 13 AE, 28 pectate/pectine lyases et 7 rhamnogalacturonane lyases potentielles ont été identifiés (Henrissat *et al.*, 2001). C'est dire la diversité des enzymes qui sont associées à la paroi et la variété des processus physiologiques dans lesquels elles peuvent intervenir. Chez les astéracées, notamment la chicorée, peu d'enzymes associées à la paroi ont été identifiées.

Les enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux, notamment celles associées aux modifications des pectines, revêtent un intérêt particulier. Elles pourraient être utilisées dans plusieurs procédés industriels utilisant des pectines. Ces dernières sont utilisées pour leurs propriétés gélifiantes, elle-même fortement dépendantes du degré de méthylation et d'acétylation de l'homogalacturonane. Il serait intéressant d'isoler des estérases agissant sur ces groupements afin de moduler les propriétés de gélification de pectines.

La première partie de ce mémoire concerne l'isolement de protéines pariétales de la racine de chicorée industrielle et la caractérisation des extraits protéiques obtenus. Initialement, l'objectif était d'isoler des acétyle estérases pariétales pour pouvoir immuniser une souris ou un lapin. Le sérum ainsi mis au point aurait permis, lors du criblage d'une banque d'expression, d'isoler un clone possédant l'insert codant pour cette enzyme. Plusieurs tests ont été menés afin de déterminer si les extraits protéiques préparés contenaient ce type d'enzyme. Les tests « cup plate » ou encore les gels d'électrophorèse réalisés ont bien confirmé la présence d'estérases dans les échantillons testés mais ils n'ont pas permis de différencier le type d'estérase isolée. Vu le temps imparti, le manque de renseignements sur les estérases isolées et surtout les faibles quantités de protéines disponibles, nous avons finalement inoculé les extraits protéiques pariétaux totaux.

Nous avons donc immunisé une souris avec les extraits totaux et, après deux rappels, le sérum a été prélevé. Différents tests ont été réalisés avant de pouvoir utiliser le sérum dans un criblage immunologique.

La spécificité et la sensibilité du sérum ont été testées en dot blot et en Western blot. Nous avons d'abord mis au point la dilution à utiliser. En effet, peu de sérum était disponible et il devait pouvoir être fortement dilué afin de cribler la banque tout en conservant sa sensibilité. Grâce au dot blot, nous avons déterminé que le sérum était encore efficace pour une dilution de 10.000 fois, ce qui nous a permis de travailler avec des grands volumes lors du criblage. Ensuite, nous avons testé en dot blot la spécificité du sérum dans les mêmes conditions que celles du criblage. Une fois le sérum épuisé, il ne reconnaît plus (ou alors très faiblement) le lysat bactérien déposé sur les membranes de PVDF testées en dot blot et il pouvait donc être utilisé pour le criblage sans craindre qu'il reconnaisse des protéines bactériennes relâchées lors de la lyse. Les différentes expériences visant à éprouver le sérum ont été concluantes et nous avons donc pu passer au criblage de la banque proprement dit.

Différents protocoles et sérums ont été utilisés, mais un seul clone a été isolé. Ce clone a été soumis à plusieurs tests sans qu'aucun ne permette d'affirmer avec certitude qu'il avait

réellement été détecté grâce au sérum et que ce n'était pas un artéfact. Malgré les doutes subsistants, nous avons décidé de le séquencer.

Suite au séquençage, différentes analyses ont été menées. La traduction de la séquence a été réalisée dans les trois phases de lecture grâce au programme Vector NTI. La présence de codons stop dans les trois phases nous incite à conclure à l'existence d'un pseudogène. Les pseudogènes sont des copies de gènes fonctionnels ayant subi des mutations pouvant entraver la transcription ou la traduction. La souche utilisée pour le criblage pourrait autoriser la traduction d'un peptide de 34 aa.

Lors de l'alignement de séquence dans le programme BlastX nous avons mis en évidence plusieurs gènes qui avaient un bon pourcentage d'homologie avec notre séquence d'intérêt. La fonction putative des gènes apparentés au pseudogène est celle d'un récepteur transmembranaire possédant un domaine riche en leucine et un domaine kinase.

Suite au criblage informatique des banques EST disponibles au laboratoire, nous avons trouvé un clone ayant une homologie avec notre séquence d'intérêt (E value de 1-57). Les extrémités 5' et 3'de ce clone ont été séquencées et alignées avec la séquence de notre clone d'intérêt. Nous obtenons 45% d'homologie entre le pseudogène et l'extrémité 5' de cet EST et 50 % avec son extrémité 3' ; cette homologie ne se situe qu'au niveau de domaine kinase putatif et pas au niveau du domaine extracellulaire de notre pseudogène. Ce type de résultat est fréquent, en effet les domaines kinases intracellulaires sont mieux conservés au point de vue de leurs séquences que les domaines extracellulaires.

Malgré les incertitudes subsistant sur la spécificité du polysérum et sur la technique utilisée, plusieurs points positifs peuvent être mis en exergue. Le clone isolé, même s'il code pour un pseudogène, permet la mise en évidence de gènes apparentés codant probablement pour des récepteurs ou des protéines kinases dans les banques EST de racines de chicorée. Ces séquences n'auraient probablement pas suscité d'intérêt si elles n'avaient pas été détectées suite au criblage informatique des banques. Le fait d'avoir pu ainsi repérer des récepteurs orphelins (auxquels aucune fonction n'a été attribuée) permet quelques perspectives intéressantes.

Perspectives

Perspectives

Au terme de ce travail, deux perspectives se dégagent. Soit on recommence à cribler des banques d'expression pour isoler des gènes codant pour des protéines pariétales. Soit on tente d'identifier les récepteurs apparentés au pseudogène découvert.

Isolement de gènes codant pour des protéines pariétales

Pour isoler des gènes codant pour des protéines pariétales, deux approches sont envisageables : soit refaire un criblage immunologique, mais au départ d'un autre polysérum, soit tenter un criblage au départ de sondes nucléotidiques mises au point à partir de séquences présentes dans les bases de données ou contre le peptide signal.

Le criblage immunologique peut être envisagé avec un autre polysérum. Il est en effet probable que le peu de résultats obtenus lors des tests de criblage soit dû à un manque de sensibilité du polysérum utilisé, la quantité de protéines synthétisées par les bactéries étant trop faible pour être détectée. La mise au point d'un sérum au départ d'une protéine pariétale purifiée en quantité supérieure afin d'immuniser un animal plus grand, pourrait être envisagée, en espérant que ce type de polysérum soit plus sensible et toujours spécifique. Le désavantage si l'on utilise ce type de test est que le criblage sera plus ciblé et qu'il ne permettra plus l'isolement de clones codant pour une gamme de protéines pariétales.

Une sonde nucléotidique pourrait être mise au point contre un peptide signal, qui permet l'adressage des protéines vers la voie de sécrétion. Cette technique serait une alternative au criblage immunologique pour des protéines qui sont sécrétées, notamment les protéines pariétales.

Le système de sécrétion peut se faire dans deux directions. La première, appelée direction antérograde, est la voie majeure de biosynthèse, dont le flux va du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique ou la vacuole. La direction rétrograde (aussi appelée flux endocytique) va dans le sens contraire de la voie de biosynthèse. Elle permet l'endocytose des molécules extracellulaires et le recyclage de membranes et de protéines (Sanderfoot et Raikhel, 2003). La première étape de la voie de sécrétion antérograde est la translocation des protéines solubles dans le RE et elle dépend de la présence d'un peptide signal à l'extrémité N- terminale de la protéine (Buchanan, Gruissem, Jones, 2000). Le peptide signal est clivé par une peptidase lors de la translocation de la protéine dans la lumière du RE. Une fois dans le RE, les protéines destinées à la sécrétion sont glycosylées et repliées. Ensuite elles passent dans l'appareil de Golgi où elles continuent leur maturation et ce, depuis la citerne CIS du Golgi jusqu'à la citerne TRANS. Enfin les protéines sont sécrétées (Vitale A., 1999).

Les peptides signaux qui permettent d'envoyer les protéines en cours de synthèse vers la voie de sécrétion contiennent une structure générale commune, mais pas de consensus de séquence. Ils sont composés d'une région n petite et chargée positivement, d'une région h centrale et hydrophobe, et d'une région c plus polaire et qui est adjacente au site de clivage de la peptidase (Heijne and Abrahmsen, 1989 ; Slabas et al, 2004). Le motif le plus conservé est la présence d'acides aminés petits et neutres aux positions -1 et -3 du site de clivage.

La mise au point d'une sonde nucléotidique contre le peptide signal présente l'avantage que le criblage reste assez général et permettrait probablement l'isolement de plusieurs clones. En contrepartie, il est difficile de différencier les protéines pariétales ou membranaires si elles n'ont pas d'homologues dans les banques de données. En outre, le manque de motifs communs au niveau du signal peptidique peut rendre difficile la mise au point d'une telle sonde nucléotidique.

Le criblage à l'aide d'une sonde nucléotidique mise au point au départ d'une séquence ayant une forte homologie dans une banque de donnée est une approche largement documentée dans la littérature (par exemple Min *et al.*, 2000). L'avantage de cette technique est qu'elle permet l'isolement de familles de gènes fort semblables (autant de gènes fonctionnels que de pseudogènes) et qu'elle a déjà fait ses preuves. L'inconvénient est qu'elle ne permet pas de mettre en évidence de nouveaux gènes, car la séquence à isoler doit être connue préalablement (même chez un autre organisme).

Isolement de récepteurs putatifs

Les fonctions des RLK (receptor like kinase) végétaux sont loin d'avoir été toutes élucidées mais elles semblent intervenir dans divers processus tels que la réponse d'auto-incompatibilité, la réponse aux pathogènes, la morphogenèse de la plante… Les RLK pourvu d'un domaine LRR constituent le plus grand groupe de récepteurs kinases dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* avec 216 membres identifiés (Diévart et *al.*, 2004). A peine une dizaine ont une fonction connue, et seulement quelques uns ont été étudiés de manière approfondie. Chez les astéracées, en particulier chez la chicorée industrielle, aucune étude n'est menée sur ce sujet à l'heure actuelle. Au départ du pseudogène isolé (qui montre une forte homologie avec des récepteurs LRR), il serait possible de mettre au point des sondes nucléotidiques afin d'identifier des gènes apparentés en criblant des banques de racines de chicorée. De nouveaux RLK possédant un domaine extracellulaire de type LRR pourraient être détectés. L'isolement de un ou plusieurs clones de cDNA encodant des RLK isolés permettrait d'étudier le schéma d'expression de ces gènes et les propriétés biochimiques des récepteurs (Takahashi et *al.*, 1997).

Aussi bien les plantes que les animaux utilisent des récepteurs contenant des domaines LRR pour détecter des peptides pathogènes spécifiques. Par exemple chez la plante, le gène FLS2 code pour un RLK-LRR. Des mutations aussi bien dans son domaine kinase que LRR affectent l'activité de liaison d'un domaine très conservé de la flagelline (flg22). Sa liaison déclenche une voie de transduction menant à l'activation de différents gènes impliqués dans la réponse de défense, ce qui confère une résistance aux bactéries (Diévart *et al.*, 2004). Xa21 (chez le riz) code aussi pour un RLK contenant un domaine LRR et confère une résistance « race spécifique » à la plante contre *Xanthomonas oryzae* (Wang *et al*, 1998).

Un objectif de lutte contre les pathogènes végétaux consisterait à renforcer le potentiel naturel de défense des plantes. L'identification des signaux échangés entre le pathogène, la cellule végétale et l'implication éventuelle de récepteurs dans leur perception permettrait de lutter plus efficacement contre ces pathogènes. Notre pseudogène putatif pourrait constituer un fil d'Ariane nous menant à l'isolement de récepteurs impliqués dans la réponse aux pathogènes chez la chicorée industrielle.

Bibliographie

Andrews, J., Adams, S. R., Burton, K. S. & Evered, C. E. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J Exp Bot* **53**, 2185-91 (2002).

Baluska, F., Samaj, J., Wojtaszek, P., Volkmann, D. & Menzel, D. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiol* **133**, 482-91 (2003).

Baumberger, N., Ringli, C. & Keller, B. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **15**, 1128-39 (2001).

Bell, J. K. et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**, 528-33 (2003).

Bordenave, M., Goldberg, R., Huet, J. C. & Pernollet, J. C. A novel protein from mung bean hypocotyl cell walls with acetyl esterase activity. *Phytochemistry* **38**, 315-9 (1995).

Brummell, D. A. & Harpster, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **47**, 311-40 (2001).

Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. *Bioch and mol biol of plants* (American society of plant physiologists, 2000).

Carpita, N., Tierney, M. & Campbell, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol Biol* **47**, 1-5 (2001).

Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**, 1-30 (1993).

Cassab, G. I. Plant Cell Wall Proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 281-309 (1998).

Christensen, T. M. I. E., Nielsen, J. & Mikkelsen, J. *Isolation, characterization and immuno localization of orange fruit acetyl esterase* in ed. Visser J., Voragen A., Pectins and Pectinases, Progress in Biotechnology, vol 14,Elsevier Editors, Amsterdam (1996).

Cosgrove, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol* **125**, 131-4 (2001).

Decreux, A. & Messiaen, J. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant and Cell Physiol* **46**, 268-278 (2005).

Delaveau, P., Lorrain, M., Mortier, F., Rivolier, C., Rivolier, P & Schweitzer, R. *Secrets et vertus des plantes médicinales,* Sélection du Reader's Digest, Paris-Bruxelles-Zurich, (1977).

Delseny, M., Echeverria, M. & Lasserre, E. *Structure physique du génome nucléaire des plantes* in eds. Morot-Gaudry, J.-F. & Briat, J.-F., INRA éditions, Paris, (2004).

Dievart, A. & Clark, S. E. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 507-16 (2003).

Dievart, A. & Clark, S. E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* **131**, 251-61 (2004).

Fry, S. C. *Wall enzymes* in Longman, London (1988).

Fry, S. C. Polysaccharide-Modifying Enzymes in the Plant-Cell Wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**, 497-520 (1995).

Fry, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist* **161**, 641-675 (2004).

Gibson, G. & Muse, S. V. *Protéomique et génomique fonctionnelle* in De Boeck Université S.A. Bruxelles (2004).

Graves, P. R. & Haystead, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63; table of contents (2002).

Guo, H. & Ecker, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 40-9 (2004).

Hardie, D. G. PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 97-131 (1999).

He, Z. H., Fujiki, M. & Kohorn, B. D. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 19789-93 (1996).

Henrissat, B., Coutinho, P. M. & Davies, G. J. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **47**, 55-72 (2001).

Jose-Estanyol, M. & Puigdomenech, P. Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiol and Bioch* **38**, 97-108 (2000).

Kajava, A. V. & Kobe, B. Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information. *Protein Science* **11**, 1082-1090 (2002).

Kobe, B. & Kajava, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curt Op in Struct Biol* **11**, 725-732 (2001).

Kohorn, B. D. Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiol* **124**, 31-8 (2000).

Kroon, P. A., Faulds, C. B. & Williamson, G. *Enzymic release of ferulic acid from sugar beet pulp using a specific esterase from Aspergillus niger* in ed. Visser J., Voragen A., Pectins and Pectinases, Progress in Biotechnology, vol 14,Elsevier Editors, Amsterdam (1996).

Lambinon, J., Delvosalle, L. & Duvigneaud, J. *Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines (Ptéridophyte et Spermatophytes)*, Editions du Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, Meise, (2004).

Lee, S. J. et al. Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol Biochem* **42**, 979-88 (2004).

Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. & Michelmore, R. W. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 809-34 (2003).

Min, X., Okada, K., Brockmann, B., Koshiba, T. & Kamiya, Y. Molecular cloning and expression patterns of three putative functional aldehyde oxidase genes and isolation of two aldehyde oxidase pseudogenes in tomato. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 337-41 (2000).

Nielsen, J. E. & Christensen, T. M. I. E. Distribution of pectin methyl esterase and acetylesterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography. *Plant Science* **162**, 799-807 (2002).

O'Neill, M. A. & York, W. S. *The composition and structure of plant primary cell walls* in ed. Rose, J., Blackwell publishing Ltd, Oxford, (2003).

Passardi, F., Penel, C. & Dunand, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* **9**, 534-40 (2004).

Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. *Biologie végétale* in De Boeck Université S.A., Bruxelles (2000).

Ridley, B. L., O'Neill, M. A. & Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-67 (2001).

Robertson, D. et al. Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J of Biol Chem* **272**, 15841-15848 (1997).

Rose, J., Catala, C., Gonzalez-Carranza, Z. H. & Roberts, J. A. *Cell wall disassembly* in ed. Rose, J., Blackwell publishing (2003).

Sachetto-Martins, G., Franco, L. O. & de Oliveira, D. E. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim Biophys Acta* **1492**, 1-14 (2000).

Sanderfoot, A. A. & Raikhelb, N. V. *The secretory system of arabidopsis,* ed. American society of plant physiologists, (2003).

Searle-van Leeuwe, M. J. F., Vincken, J.-P., Schipper, D., Voragen, A. G. J. & Beldman, G. *Acetyl esterase of Aspergillus niger : purification and mode of action on pectins* in ed. Visser J., Voragen A., Pectins and Pectinases, Progress in Biotechnology, vol 14, Elsevier Editors, Amsterdam (1996).

Shiu, S. H. & Bleecker, A. B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10763-8 (2001).

Showalter, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**, 9-23 (1993).

Sivy, M., Joyard, J. & Rossignol, M. *La protéomique et ses applications en biologie végétale* (eds. Morot-Gaudry, J.-F. & Briat, J.-F.) (INRA éditions, Paris, 2004).

Slabas, A. R., Ndimba, B., Simon, W. J. & Chivasa, S. Proteomic analysis of the Arabidopsis cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. *Biochem Soc Trans* **32**, 524-8 (2004).

Takahashi, T., Mu, J. H., Gasch, A. & Chua, N. H. Identification by PCR of receptor-like protein kinases from Arabidopsis flowers. *Plant Mol Biol* **37**, 587-596 (1998).

Tijsen, P. *Practice and theory of enzyme immunoassays* in eds. Burdon, R. H. & van Knippenberg, P. H., Elsesevier Science Publishers, Amsterdam, (1985).

Torii, K. U. Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 361-7 (2000).

Tucker, G. A. & Seymour, G. B. *Modification and degradation of pectin* in ed. Seymour, G. B. a. Knox, J. Paul, Blackwell publishing (2002).

Van den Ouweland, A. M. et al. Characteristics of a multicopy gene family predominantly consisting of processed pseudogenes. *Nucleic Acids Res* **17**, 3829-43 (1989).

van Wijk, K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol* **126**, 501-8 (2001).

Vincken, J. P. et al. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**, 1781-1789 (2003).

Vitale, A. & Denecke, J. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**, 615-28 (1999).

Voelker, T. A., Moreno, J. & Chrispeels, M. J. Expression analysis of a pseudogene in transgenic tobacco: a frameshift mutation prevents mRNA accumulation. *Plant Cell* **2**, 255-61 (1990).

von Heijne, G. & Abrahmsen, L. Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett* **244**, 439-46 (1989).

Wang, G. L. et al. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**, 765-79 (1998).

Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. & Knox, J. P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**, 9-27 (2001).

Zhang, X. R. Leucine-rich repeat receptor-like kinases in plants. *Plant Mol Biol Reporter* **16**, 301-311 (1998).