

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution au clonage de pectine méthylestérase: production de sondes génomiques chez deux solanaceae, la tomate (Lycopersicon esculentum) et la pomme de terre (Solanum tuberosum)

SIMON, Valérie

Award date: 1992

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.

011292

Contribution au clonage de pectine méthylestérase : production de sondes génomiques chez deux solanaceae, la tomate (Lycopersicon esculentum) et la pomme de terre (Solanum tuberosum).

SIMON VALERIE

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

Contribution au clonage de pectine méthylestérases : production de sondes génomiques chez deux solanaceae, la tomate (<u>Lycopericon esculentum</u>) et la pomme de terre (<u>Solanum tuberosum</u>).

SIMON Valérie

Résumé

Au cours de ce travail, nous avons produit deux sondes génomiques de pectine méthyl estérases (PME), une enzyme catalysant la déméthyl-estérification des acides galacturoniques de polysaccharides pectiques caractéristiques de la lamelle mitoyenne, paroi primaire et jonctions intercellulaires des cellules végétales. Avec deux couples d'amorces, nous avons amplifié plusieurs gènes de pectine méthyl estérases au départ d'ADN de tomate et de pomme de terre. Nous avons obtenu un profil d'amplification spécifique de chaque expérience. Par southern, nous avons démontré que seul un produit d'amplification spécifique du végétal et du couple d'amorces appartient au groupe des pectine méthyl estérases. Dès lors, nous avons caractérisé les conditions optimales de production de ces sondes génomiques qui permettront une étude génétique des PME chez ces solanacées.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques) Décembre 1992 Promoteur : P. Van Cutsem Co-promoteur : J.-M. Jacquemin, Station d'amélioration des plantes (Gembloux). Au terme de ce travail, je remercie Monsieur le professeur P. Van Cutsem pour les judicieux conseils qu'il m'a donnés tout au long de l'année.

Je remercie Monsieur G. Clamot pour son acceuil au sein du laboratoire de la station d'amélioration des plantes ainsi que Monsieur J.-M. Jacquemin pour ses précieux conseils.

J'adresse également tous mes remerciements à Mesdames Delporte F., Mingeot D., Masson M.-J., Mélard A., Kutten L, Baleux R et Messieurs Dekeyser A. et Vanrossome B. pour leur aide efficace, leur patience et leur dénouement tout au long de cette année ainsi que toutes les personnes qui d'une façon ou d'une autre, m'ont renseignée et encouragée durant mon mémoire.

Je désire dédicacer tout particulièrement ce travail à mes parents afin de les remercier.

1. INTRODUCTION

A. LA PAROIS CELLULAIRE	1
B. LES POLYSACCHARIDES PARIETAUX	2
1. La cellulose	2
2. Les hemicelluloses	2
	2
b Les xyladucanes	2
c les ducomannanes	2
d Les mannanes et galactomannanes	3
d. Les mannanes et galaciomannanes	5
3 Les pectines	3
	Ŭ
a. Les homogalacturonanes	3
b. Le rhamnogalacturonane de type l	4
c. Le rhamnogalacturonane de type II	5
d. Organisation des petines	5
e. Localisation des polysaccharides pectiques	5
f. Biosynthèse des pectines	6
4. Agencement des polysaccharides pariétaux	7
C. PECTINE METHYL ESTERASES	9
D. BUT DU TRAVAIL	12
2. MATERIELS ET METHODES	13
A. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE	13
1. Principe	13
2. Solutions	13
3. Protocole	14
4. Vérification de l'extraction	15
5. Estimation de la concentration par spectrophotométrique	16

B. AMPLIFICATION D'ADN	17
 Principe Protocole Choix des températures Contrôles d'amplification Vérification de l'amplification 	17 17 18 19 19
C. CLONAGE	19
1. Principe 2. Préparation du plasmide	19 20
 a. Linéarisation b. Déphosphorylation c. Purification du plasmide d. Vérifications d.1. La linéarité se vérifie par électrophorèse d.2. La déphosphorylation se vérifie par une transformation 	20 21 21 22 22 22 22
3. Préparation de l'ADN amplifié 4. Ligation	23 25
a. Méthode classique b. Méthode spécifique aux produits PCR	25 25
5. Transformation	26
a. Principe b. Préparation de cellules compéténtes c. Protocole	26 26 27
6. Extraction d'ADN plasmidique (miniprep)	28
a. Principe b. Protocole	28 28
D. SOUTHERN	29
1. Principe 2. Méthode	29 29

a. Transfert d'ADN	29
c L'hybridation	31
d. Préparation de la sonde	31
Par nick translation	31
e. La révélation	32
E. CRIBLAGES DE BANQUES D'ARABIDOPSIS THALIANA	33
1. Principe	33
2. Le titrage des banques	33
a. Banque cDNA	33
b. Banque génomique	33
C. Protocole	34
3. Le criblage des banques	35
a. Le transfert	35
b. La préhybridation	35
c. L'hybridation	36
d. La révélation	36
e. Purification des ciones hybridant	36
RESULTATS	37
A. PRODUCTION DE SONDES GENOMIQUES DE PME	37
1. Obtention d'ADN génomique	37
2. Choix des amorces	38
a. Comparaisons de séquences	38
b. Alignement multiple	39
c. Choix des amorces 1/2	40
a. Choix des amorces 3/4	41
3. Mise au point de l'amplification sur cDNA	42
4. Mise au point de l'amplification sur ADN génomique	45
a. Utilisation des amorces 1/2.	45
b. Utilisation des amorces 3/4.	49
c. Verification des amplifications par un southern.	51

3.

B. TENTATIVE DE CLONAGE.	54
 Préparation du plasmide. Insertion de l'ADN amplifié. Vérification par southern. 	54 55 58
C. TENTATIVE DE CRIBLAGE DE BANQUES D'ARABIDOPSISI.	58
1. Titrage des banques.	59
a. Banque cDNA. b. Banque génomique.	59 60
2. Le criblage des banques.	61
a. Banque cDNA. b. Banque génomique.	61 61
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	63

5. BILIOGRAPHIE.

64



Figure 1.1 : Formation de la parol primaire lors de la division cellulaire.

1. INTRODUCTION

A. LA PAROI CELLULAIRE.

La paroi cellulaire, riche en hydrate de carbone, représente une des caractéristiques essentielles de distinction de la cellule végétale vis à vis de la cellule animale.

Elle se compose d'une phase matricielle et d'une phase microfibrillaire représentées par la cellulose, la pectine, l'hémicellulose et les glycoprotéines.

Sa formation débute lors de l'anaphase par l'apparition d'un phragmoplaste au niveau de la plaque équatoriale. Cette zone, riche en microtubules, se voit envahie par des vésicules d'origine golgienne à contenu polysaccharidique qui semblent dirigées par ces microtubules. Les vésicules fusionnent dans cette zone afin de créer la lamelle mitoyenne. La paroi primaire quant à elle sera élaborée par sécrétion de polysaccharides non cellulosiques et synthèse de cellulose au niveau du plasmalemme durant la croissance cellulaire (figure 1.1).

Les plasmodesmes (connections entre cellules) apparaissent durant la formation de la lamelle mitoyenne là où les vésicules ne fusionnent pas et laissent des pores d'environ 400 nm de diamètre. (Hall, 1982)

A la fin de la croissance, la paroi secondaire se dépose par apposition de couches successives sur la paroi primaire. Il s'agit d'une paroi rigide comprenant de nombreuses couches se distinguant par l'orientation des microfibrilles de cellulose la composant.

La paroi cellulaire est capitale pour la cellule végétale car elle réalise des fonctions vitales :

- elle constitue le squelette du végétal en déterminant sa morphogenèse,
- elle joue le rôle de barrière protectrice contre les attaques extérieures,
- elle contient la phase liquide de référence de la cellule végétale,
- elle libère des oligosaccharides dont certains pourraient agir comme molécules régulatrices de la physiologie végétale. (Albersheim, 1985)



Figure 1.2 : Chaînes de β-1,4 -D glucose composant la cellulose. (Smith, 1977)



Figure 1.3 : Chaînes latérales observées chez les xylanes. (Mc Neil, 1984)

 $\rightarrow 4-D-Glc \xrightarrow{\beta} 4$

Figure 1.4 : Nonasaccharide et heptasaccharide isolés de xyloglucanes. (Mc Neil, 1984)

B. LES POLYSACCHARIDES PARIETAUX.

Trois classes de polysaccharides sont présents dans les parois végétales :

- la cellulose,
- les hémicellulose,
- les pectines.

1. LA CELLULOSE.

Il s'agit d'un agrégat fibrillaire de chaînes de glucane : polymère de β -1,4-D glucose. Les polymères forment des ponts hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires afin de stabiliser l'agrégat en microfibrilles (figure 1.2.). Constituant majeur de la paroi secondaire, on la retrouve également dans la paroi primaire mais elle y présente un poids moléculaire plus faible. On estime son degré de polymérisation de 2000 à14000 unités (Hall, 1982) Elle représente 20 à 30% de la matière composant la paroi primaire (Mc Neil, 1984).

2. LES HEMICELLULOSES.

Il s'agit d'un groupe de polymères dont le squelette est composé d'unités liées en β -1,4. Ils relient la phase microfibrillaire et la matrice en effectuant des ponts hydrogènes avec la cellulose.

On y regroupe :

a. Les xylanes.

Composant majeur des parois de monocotylédones, ce sont des polymères de β-1,4-D Xylose en chaîne principale.

On distingue :

- des arabinoxylanes présentant, en début de chaîne latérale, un arabinose lié en α -1,2 ou α -1,3 au xylose.
- des acides glucuroniques liés en α -1,2 en début de chaîne latérale (figure 1.3.).

b. Les xyloglucanes.

Il s'agit de polymères de β -1,4-D glucose formant le squelette sur lequel se greffent des xyloses en α -1,6 (figure 1.4.). On les retrouve chez les dicotylédones (20%) et les monocotylédones (2%). c. Les glucomannanes.

Retrouvé majoritairement chez les gymnospermes, ils s'agit de polymères de β -1,4-D glucose et mannose répétés sans ordre selon un rapport glucose 1 : mannose 3.

d. Les mannanes et galactomannanes.

Il s'agit de polymères de β -1,4-D mannose formant le squelette et présentant un galactose lié en α -1,6 en chaîne latérale. Ils sont présents dans l'endosperme comme substance de réserve et sous forme de microfibrilles chez certaines algues (Mc Neil,1984).

3. LES PECTINES.

Ce sont des polysaccharides ramifiés riches en acides galacturoniques, mais aussi en rhamnose, arabinose et galactose. On les retrouve dans la lamelle mitoyenne et la paroi primaire des dicotylédones, mais très peu chez les monocotylédones. Elles font partie des polysaccharides solubles chargés négativement. Il est d'ailleurs facile de les extraire de façon chimique (solubilisation) en augmentant le pH et en ajoutant de l'EDTA, agent complexant de cations.

Elles se composent : - d'homogalacturonanes,

- de rhamnogalacturonanes de type I,

- de rhamnogalacturonanes de type II.

a. Les homogalacturonanes.

Ces polysaccharides sont des polymères α -1,4-D d'acides galacturoniques pouvant être méthyl estérifiés à des degrés divers (figure 1.5.). Ils sont synthétisés sous forme de pectine (Liners F., 1992) c'est-à-dire fortement méthyl estérifiés (à plus de 50%) dans le golgi. Ils se nommeront acides pectiques dans le cas contraire. Cette nomenclature n'est pas toujours correcte : en effet, pectine désigne souvent l'association covalente de l'homogalacturonane et des rhamnogalacturonanes I et II. (Mc Neil, 1984)



Figure 1.5 : Méthyl estérification d'acide galacturoniques. (Chaplin, Kennedy, 1986)

side chain 4 4-D-GalA S 2-L-Rha S 4-D-GalA S 2-L-Rha S 4-D-GalA S 2-L-Rha S 4-D-GalA S 2-L-Rha S 4-D-GalA S 2-L-Rha S

Figure 1.6. : Squelette du rhamnogalacturonane de type I. (Mc Neil, 1984)



Figure 1.7 : Chaînes latérales présentes dans le rhamnogalacturonane de type l. (Mc Neil, 1984)

b. Le rhamnogalacturonane de type I.

Polysaccharide très étudié, car facilement isolé de culture en suspension de cellules d'érable Sycomore par une endopolygalacturonase, il présente un squelette ramifié lui conférant un aspect hérissé et un degré de polymérisation de 2000 unités après traitement enzymatique.

La chaîne principale est constituée de résidus L-rhamnoses (α -1,2) et D-acides galacturoniques (α -1,4) alternés dont_la moitié des rhamnoses porte en position C4 une chaîne latérale d'arabinoses et de galactoses liés de diverse manières, ce qui suggère une grande diversité (figures 1.6 et 1.7).

On distingue :

- Les arabinanes : Ce sont des polymères d' α -1,5 arabinoses fortement ramifiés en position C2 ou C3 par des arabinoses (α -1,2 ou α -1,3).
- Les galactanes : Ce sont des polymères de β-1,4 galactoses non ramifiés.
- Les arabinogalactanes de type I : Ce sont des polymères de β-1,4 galactoses ramifiés en position C3 par des arabinoses liés en β-1,5.
 - On les retrouve toujours liés aux homogalacturonanes.
- Les arabinogalactanes de type II : Ce sont des polymères de β-1,3 galactoses ramifiés en position C6 par des arabinoses liés en B-1,6 et des galactoses liés en β-1,6.

On les retrouve toujours associés à des protéines sous des rapports différents.

Le rhamnogalacturonane de type I présente une alternance régulière rhamnoses-acide galacturonique dans son squelette, ce qui casse la linéarité de la chaîne en introduisant des angles de 90° nommés coudes pectiques. Ils sont associés de manière covalente aux chaînes d'homogalacturonanes (région lisse) afin de créer la pectine (Mc Neil, 1984).





Figure 1.8 : Heptasaccharides isolés de rhamnogalacturonane de type II. (Mc Neil, 1984)

A)







Figure 1.10. : Réseau de pectines dans la paroi cellulaire (Brett, 1990).

c. Le rhamnogalacturonane de type II .

Polysaccharide très complexe, il se retrouve en quantité mineure chez l'érable sycomore où il fut étudié. Il semble lié de façon covalente à une série d' α -1,4-D acides galacturoniques des homogalacturonanes. Il présente un degré inhabituel de polymérisation de 60 unités. On y distingue, en plus des sucres habituels (acides galacturoniques, galactoses, rhamnoses et arabinoses), de l'acide acérique, du KDO (3-déoxy-manno-octulosonic acide) et de l'apiose. Des études (Mc Neil, 1984) ont montré la présence de 4 unités d'heptasaccharides A et 2 unités d'heptasaccharides B comptant pour 60% de résidus glycosylés dans le rhamnogalacturonane de type II (figure 1.8).

d. Organisation des pectines.

La pectine, composée de chaînes d'acides homopolygalacturoniques liées de façon covalente aux rhamnogalacturonanes, est un polysaccharide chargé négativement par son contenu en acides galacturoniques. De ce fait, elle présente une affinité non négligeable pour les cations dont le calcium.

En présence de Ca⁺⁺, deux chaînes d'acides homopolygalacturoniques s'associent coopérativement en boîtes à oeufs (figure 1.9.) car la fixation du premier Ca⁺⁺ favorise l'association d'un second avec les deux chaînes. Cette dimérisation est suivie d'une multimérisation entre chaînes d'acides homopolygalacturoniques. La présence d'acides galacturoniques méthyl-estérifiés et de coudes pectiques causés par le rhamnose des rhamnogalacturonanes inhibe l'association des chaînes en présence de calcium afin d'éviter la précipitation des pectines en favorisant la création de réseaux hydratés entre plusieurs chaînes : on définit cette structure sous le nom de gel calcique (figure 1.10.). (Brett, 1990)

e. Localisation des polysaccharides pectiques.

L'utilisation d'un anticorp monoclonal : 2F4, reconnaissant un motif conformationnel lors d'associations dimériques de chaînes homopolygalacturoniques sous l'action du calcium (Liners, Letesson, 1989 Liners, Thibault, 1992), dans des expériences immunocytochimiques a permis de localiser les polysaccharides pectiques.







1 1

Figure 1.12. : Schéma de biosynthèse des polysaccharides pariétaux. (Hall, Flowers, Roberts, 1982)

On remarque :

La présence de polysaccharides pectiques acides dans les jonctions et espaces intercellulaires chez les cellules jeunes et matures et dans la paroi primaire chez les cellules en sénescence lorsque le plasmalemme est rompu (Liners, Van Cutsem, 1992).

La présence de polysaccharides pectiques méthyl-estérifiés (pectines) dans la paroi primaire, la lamelle mitoyenne et vésicules golgiennes chez les cellules matures et dans les vésicules golgiennes et lamelle mitoyenne chez les cellules jeunes (Liners, Van Cutsem, 1992).

f. Biosynthèse des pectines.

Par opposition à la synthèse de cellulose s'effectuant au niveau du plasmalemme, tous les autres polysaccharides de la paroi sont synthétisés au départ de l'appareil de golgi.

L'hypothèse de synthèse généralement admise (figure 1.11.) implique une synthèse d'une chaîne rhamnogalacturonique à partir de nucléotides glycosylés suivie d'une méthylation des groupements carboxyliques via l'action d'une méthyl-transférase utilisant la S-adénosyle-méthionine. Il y aurait également acétylation durant cette étape. Les chaînes latérales seraient incorporées au squelette pectique sous forme polymérisée par l'intermédiaire d'une transférase et non incorporations successives d'unités d'oses (Saulnier, 1987).

Lors de la division cellulaire, les vésicules ainsi constituées, semblent dirigées par un système de microtubules vers la plaque équatoriale, lieu de formation de la lamelle mitoyenne, pour y déverser leur contenu en polysaccharides matriciels (figure 1.12.).

Lors de la croissance cellulaire, les polysaccharides pectiques sont également synthétisés dans le golgi de façon fortement méthyl éstérifiés. La distribution intermoléculaire des groupes méthylés est hétérogène : les homogalacturonanes présentent environ 70% de degré de méthylation (DE) et les pectines possèdent presque toutes une petite quantité de molécules de 50% de DE et un grand nombre de molécules de 95% de DE. Tandis que la distribution intramoléculaire des groupes méthylés s'effectue au hasard (de Vries, 1982). Les dictyosomes de cellules jeunes et matures contiennent bien des polysaccharides pectiques méthyl-estérifiés car le 2F4 ne les marque qu'après une déestérification enzymatique. De plus, le marquage des dictyosomes avec le 2F4 (l'épitope reconnu par le 2F4 est différent de ceux reconnus par JIM5 et JIM7) est plus faible que celui avec le JIM5 (anticorps monoclonal dirigé contre les polysaccharides pectiques non estérifié) et JIM 7 (anticorps monoclonal dirigé contre les polysaccharides pectiques estérifiés de DM>20%), ce qui indique que les vésicules golgiennes contiennent des pectines dont seul un petit nombre sont capables de s'associer en "boîtes à oeufs". (Liners, Van Cutsem, 1992)

On remarque également que tous les dictyosomes ne sont pas marqués chez les cellules jeunes, ce qui indiquerait un phénomène possible de spécialisation de cette fonction. (Liners, Van Cutsem, 1992)

Les polysaccharides non cellulosiques sont transportés par des vésicules golgiennes vers le plasmalemme et sont retrouvés dans les espaces et jonctions intercellulaires sous forme acide et dans la paroi primaire et lamelle mitoyenne sous forme méthyl-estérifiées aussi bien chez les cellules jeunes que matures (Liners, Van Cutsem, 1992).

4. AGENCEMENT DES POLYSACCHARIDES PARIETAUX.

L'organisation de la paroi cellulaire étant très complexe, nous décrirons ici un schéma simple non exhaustif. (Smith, 1977)

Ce modèle (figure 1.13) s'explique par :

- des interactions calciques entre chaînes d'homogalacturonanes formant une structure en boîtes à oeufs,
- des interactions covalentes entre chaînes homogalacturoniques et rhamnogalacturonanes I et II,
- des interactions covalentes entre des ramifications β-1,3arabinogalactanes du rhamnogalacturonane I et une protéine (l'extensine) riche en hydroxyprolines (40%),
- des interactions hydrogènes entre hémicelluloses (xyloglucanes) et des ramifications β-1,4 arabinogalactanes du rhamnogalacturonane I,
- des interactions hydrogènes entre hémicelluloses et celluloses, les microfibrilles de cellulose étant reliées parallèlement par des ponts hydrogènes intra et intermoléculaires.



Figure 1.15. : Modèle décrivant la structure pariétale (Keegstra, 1973).



Si ce modèle éclaire quelque peu les relations entre les phases matricielle et microfibrillaire, il ne peut être pris comme modèle absolu car certaines interactions, telles la réticulation des pectines par l'acide férulique et des tyrosines d'extensines, ne sont pas prises en considération (figure 1.14).

Un autre modèle (figure 3.15.) est également pris en considération, il s'agit du modèle développé par Keegstra en 1973 et revu par Albersheim en 1978.

Il se base sur :

- l'existence de liens covalents entre xyloglucanes et polysaccharides pectiques,
- l'existence de liens non covalents (mais de force égale à ce type de lien) entre xyloglucanes et microfibrilles de cellulose,
- l'existence de liens entre rhamnogalacturonane et protéine riche en hydroxyprolines via un arabinogalactane très ramifié.

Il y aurait création d'un réseau par lien d'un polysaccharide pectique à plus d'une microfibrille de cellulose via le xyloglucane et lien d'une microfibrille de cellulose à plus d'un polysaccharide pectique via le xyloglucane (Keegstra, 1973).

Comme on peut le voir, il est presque impossible d'établir un seul modèle compréhensible. Il vaut donc mieux visualiser la paroi cellulaire comme un ensemble de réseaux complexes de polymères qui, en étant superposés, interagissent pour créer la parois cellulaire (Brett, 1990).

8

C. PECTINES METHYL ESTERASES.

Lors de la croisance, différenciation et sénescence de la cellule, on obsèrve une diminution du degré de méthylestérification des polysaccharides pectiques.

En effet, la pectine acide n'est jamais observée dans la paroi primaire des cellules jeunes et matures ni dans celle des cellules sénescentes au plasmalemme intact ; ce qui signifierait que leur détection dans les cellules plus vieilles serait caractéristique de la mort cellulaire (Liners, Van Cutsem, 1992).

L'apparition de pectine acide peut s'expliquer de deux manières :

- Par déestérification enzymatique in situ dans la paroi,
- Par des modifications du processus endomembranaire de méthylestérification.

Or l'absence de détection de pectine acide avec l'anticorps 2F4 sur la face interne de la paroi primaire proche du plasmalemme (dernière couche déposée) et dans le cytoplasme permet de penser que la diminution du degré de méthyl-estérification durant le vieillissement n'est pas dû à des modifications du processus de méthylation dans le système endomembranaire (Liners, Van Cutsem, 1992).

L'apparition de pectines acides proviendrait alors d'une déestérification enzymatique in situ. Les pectines méthyl estérases semblent de bons candidats à ce rôle.

Il s'agit d'enzymes catalysant la déméthylation du groupe carboxyl en C6 des acides galacturoniques. Les pectines méthyl estérases végétales déestérifient séquentiellement tandis que les PME fongiques et bactériennes le font aléatoirement en travaillant sur plusieurs chaînes.

Elles participent au turn over de la cellule en préparant la pectine à l'attaque d'autres enzymes telles les polygalacturonases lors du mûrissement et dégénerescence du fruit chez la tomate. (Fischer, Bennet, 1991)

Elles agiraient en des régions spécifiques telles les jontions et espaces intercellulaires où elles ont été détectées chez la tomate (Chamberland, 1991).

Il existerait au moins 3 gènes de PME chez la tomate (Fischer, 1991, Woodrow, 1990).





Figure 1.16. : Séquence protéique de PME 1_LYCES. (Markovic, 1986).

(continued)

Deux isoenzymes ont été identifiées chez la tomate :

- L'une de 33239 daltons, possédant un léger excès de résidus basiques compatible avec le caractère basique des PME. (figure 1.16.)
 L'analyse des acides aminés a été réalisée avec des fragments de PME de tomate (*Lycopersicon esculentum Immuna*) obtenus par différentes digestions. (Markovic, Jörnvall, 1986)
- La seconde a été obtenue par criblage d'une banque cDNA de tomate (Lycopersicon esculentum Alisa Craig) avec des oligonucléotides synthétisés au départ de la séquence en acides aminés de la première isoenzyme. La protéine du clone cDNA isolé présente une masse moléculaire de 34485 daltons. Elle possèdent une séquence nucléolitique de 1665 bases avec une ORF comprise entre les bases 174 et 1342 donnant une protéine mature de l'aa 58 à 305 (figure 1.17). Il s'agit également d'une protéine très hydrophobe. (Ray, 1988)

En comparant les deux séquences, on détecte :

1° 39 aa différents dont 21 entraînant une variation de charges.

Deux explications sont possibles :

- Soit il s'agit de différences variétales, or les travaux sur les polygalacturonases intervenant lors du mûrissement chez la tomate n'ont pas montré de différences notables entre variétés.
- Soit il s'agit d'une seconde isoenzyme, ce qui semble le plus probable.
- 2° 4 changements de continuité des acides aminés.

Deux explications sont possibles:

- Soit il existe des modifications post-translationnelles, or la taille du cDNA est de 1,6 kb et celle de la séquence obtenue à partir de la protéine également. De plus, il n'y a qu'une ORF.
 Donc, ce genre de modifications n'a pas lieu.
- Soit il y aurait eu des problèmes lors de l'analyse des peptides obtenus par digestion. Etant une expérience laborieuse, cela semble la meilleure hypothèse (Ray, 1988).



eu Met Glu Ser Ser Gly Lys Asp Ile Gly Ala Asn Ala Yal Yal Ala Lys Asp Gly Thr Gly Lys Tyr Arg Thr Leu Ala

1. Alter and the second	
FnuHI Boyl Miul Alui Psti Amore 3 Spoi Thai	Hgal Mnll Mnll
ACTTCGACAACGACGTCGTGGTCTATTCTCATTCTGCGCAATI	ACATTAAATACATTTCTCCCCTTGAATATTTCTCTTAC
mature	
6lu Ala Val Ala Ala Ala Pro Asp Lys Ser Lys Thr Arg Tyr	Val Ile Tyr Val Lys Arg Gly Thr Tyr Lys Glu Asn
Hph I	Na III NspH I Na IV Hph I Mse I
ттелестелетаесае	TEGCATETATECTACCATCATTACTEGEAGCCTTAAT
AAC TCCAC TCATCGTCCT TTTAC TTARACTACTAATAACCACT	TACCGTACATACGATGGTAGTAATGACCCTCGGAATTA
pectin	
mature	
Yal Glu Yal Ser Ser Arg Lys Met Asn Leu Met Ile Ile Gly As Taq I Bin I Mbo I Taq I Imbo I <td< td=""><td>sp Gly Met Tyr Ala Thr Ile Ile Thr Gly Ser Leu Asn Nde I Sna I Pst I GCAGTT 66CAA AGGATT TATACTACAG GACAT AT 6 TAT</td></td<>	sp Gly Met Tyr Ala Thr Ile Ile Thr Gly Ser Leu Asn Nde I Sna I Pst I GCAGTT 66CAA AGGATT TATACTACAG GACAT AT 6 TAT
	64
pectin	
mature	1
Val Val Asp Gly Ser Thr Thr Phe His Ser Ala Thr Leu Ala Asu I Ec15 Ava II Alu I Alu I Spo I ACAGAACACAGCAGGACCAGCTAAACACCCAAGCTGTTGCACTT	Ala Val Gly Lys Gly Phe Ile Leu Gin Asp Ile Cys Ile Taqı Aluı Sfanı GAGTTGGAGCTGATAAGTCTGTCATAAATCGTTGTC
pectin	
mature	
	A CARLES AND

Gin Asn Thr Ala Gly Pro Ala Lys His Gin Ala Yal Ala Leu Arg Yal Gly Ala Asp Lys Ser Yal Ile Asn Arg Cys

	<u> </u>		hul
Cha I Tag I	l Britan		Ban II HgiA I Nsp IMae II Sst I Mae III Fin I
ITCGATGCTTATCAAGACACCC	TTTATGCACATTCTCAAAG	GCAAT TCTAT CAGAGC	TCCTACGTGACAGGGACTATT
AGCTACGARTAGTTCTGTGGG	АААТАССТСТААСАСТТТС	СЕТТААСАТАСТСТСС	AGGATGCACTGTCCCTGATAA
	pectin		-
II. O Ole Tee Cle Ore The L	mature		Contra Val The Cluthe Us
Ec15 HinF III FnuH	I Bby I	Alu I Alu I Mae I I AGCTC 6TAGC TAGARA	Hpa II Nci I ScrF I ACC666TAAATACCA6CAAAA
AAGTATAAGCCATTACGTCGT	CAACATAA66TCTTTAC66	TCGAGCATCGATCTTT	TEECCCATTTATEETCETTT
	pectin		
The second second second second second	mature		
	pectin		
	mature		A Contraction of the
	- Asp Pro Asn Gln Ala Thr	Gly Thr Ser Ile Gln F	Phe Cys Asp Ile Ile AlaSer
et Val Thr Ala Gin Gly Arg Thr			
et ¥al Thr Ala Gin Giy Arg Thi I	EcoR I Kmn I	Tth II Hae I Hae III Nco I Sec I Sty I Nia III	Ssp I
et Val Thr Ala Gin Giy Arg Thi I ACCTAAAACCAGTCGTGAAAGI	Ecor I Kmn I PATTCCCAACATATCTT66	Tth II Hae I Hae III Nco I Sec I Sty I Na III	Ssp I ПТАТТСААБААСТБТАБТБАТБ
et Val Thr Ala Gin Giy Arg Thi ACCTAAAAACCAGTCGTGAAAGI	EcoR I Kmn I AATTCCCAACATATCTTGG	Tth II Hae I Hae III Nco I Sec I Sty I Na III TAGGCCATGGAAAAAAA ATCCGGTACCTTTTTT	Ssp I ITATTCAAGAACTGTAGTGATG
et Val Thr Ala Gin Giy Arg Thi	EcoR I Xmn I AATTCCCAACATATCTTGG TTAAGGGTTGTATAGAACC pectin	Tth II Hae I Hae III Nco I Sec I Sty I Na III I TAGGCCATGGAAAAAAA ATCCGGTACCTTTTT	Ssp I ПАТТСААБААСТБТАБТБАТБ АТААБТТСТТБАСАТСАСТАС



Mael Nde I Na III Mae III Mse I TAATATATCCATAT GAAGT GCCAC ATGAG CAGGG CAGAG CGGAT TAAGT GTCTAA AGCAT AACAC ACAAC TCTAG T + 1440ATTA TATAGGTATACTTCA CGGTG TACTCGTCCCGTCTC GCCTAATTCA CAGATT TCGTA TTGTG TGTTG AGATCA Tyr Ile His Met Lys Cys His Met Ser Arg Ala Glu Arg Ile Lys Cys Leu Lys His Asn Thr Gln Leu Mae II Na III Dde I Mse I Mse I SnaB I CRAGCATTTACAT6GCTCATTCCTTACTACTAA6TCGTCAATAA6TTCA6TTAA6GGGTTCATAA6TTAA TATAC6 + 1520GTTC GTRAATGTAC CGAGT AAGGA ATGAT GATTC AGCAG TTATT CAAGT CAATTC CCCAAGTATT CAATT ATATG C p Lys His Leu His Gly Ser Phe Leu Thr Thr Lys Ser Ser Ile Ser Ser Val Lys Gly Phe Ile Ser • Tyr Thr Alu I SfaNI Mse I th II Spo I Spol TATA TTTATGTT66 CGATA AAGCT GAAACT6AT6 AT6CT TTAAT6 TAAT TATAGT TTTCT GAAAA AG6ATAT6 T6 T F 1600 ATAT ARATA CAACC & CTATTTC & A CTATE ACTAC TACGA AATTA CATTA ATATCA AAAGA CTTTTTCCTA TACACA lle Tyr Leu Cys Trp Arg • Ser • Asn • • Cys Phe Asn Yal Ile Ile Yal Phe • Lys Arg Ile Cys Yal SfaNI isp I ITTAG GTTTTCCCTGATGTTTATGG TTGTGGGGTGGTGGT TATGA TAAAA ATATGC AAGATG → 1665 AATC CAARA GGGAC TACAA ATACC AACAC CCCAC CACCAATACT ATTTT TATACG TTCTAC

Leu Gly Phe Pro · Cys Leu Trp Leu Trp Gly Gly Gly Tyr Asp Lys Asn Met Gln Asp

Cet isoenzyme (clone pPE1) possède :

- une séquence leader de 57 aa très hydrophobes pouvant intervenir dans l'adressage de l'enzyme comme c'est le cas pour les polygalacturonases.
- une séquence C terminale de 15 aa très hydrophobes pouvant jouer le même rôle que la séquence leader.

Par contre, il ne contient pas de sites de glycosylation Asn-Xaa-Ser et Asn-Xaa-Thr comme les polygalacturonases et son taux de trancription n'augmente pas durant le mûrissement, il est plutôt présent en grande quantité dans le fruit vert, ce qui nous permet de dire que son action et sa localisation sont différentes des polygalacturonases. Les PME sembleraient plutôt intervenir dans le métabolisme de croissance et développement du fruit avant le mûrissement. Elles augmenteraient l'action des polygalacturonases en déméthylant les pectines car les polygalacturonases catalysent plus vite l'hydrolyse des liens a-1,4-acides galacturoniques non méthylés (Fischer, 1991).

Leur étude génétique fournirait donc plus de compréhension quant à leur localisation in situ dans la paroi cellulaire et la régulation temporelle de leur action (contrôle de trancription) au cours de la différentiation cellulaire, ce qui serait d'un grand intérêt pour la recherche fondamentale concernant la parois cellulaire et ses changements mais aussi d'intérêt industriel en permettant de jouer sur l'induction (et le retard) du mûrissement du fruit.

D. BUT DU TRAVAIL.

L'objectif principal du mémoire était :

- de produire par PCR, des sondes génomiques de pectines méthyl estérases chez différents végétaux : la tomate et la pomme de terre,
- de cloner ces sondes afin de disposer d'outils de travail pour l'étude des pectines méthyl estérases,
- d'utiliser ces sondes en vue de cloner un gène de pectine méthyl estérase chez Arabidopsis thaliana.

Cette démarche génétique fournit ainsi des outils d'étude :

- de recherche du nombre de gènes de pectine méthyl estérases existant chez différents végétaux,
- de régulation de ces gènes chez différents végétaux mais aussi chez Arabidopsis thaliana qui est un modèle d'étude pour les gènes végétaux,
- d'explication de la localisation des pectines méthyl estérases (adressage...),
- d'explication de l'action temporelle des pectines méthyl estérase (régulation temporelle).

Ce travail s'inscrit dans un programme d'étude des constituants pectiques de la paroi cellulaire, de la croissance et de la différentiation cellulaire.

Il est en effet interessant d'étudier ces enzymes car si leur fonction générale est connue et que leur localisation intercellulaire a pu être prouvée, on ne sait ni où, ni quand, ni comment elles agissent dans les phénomènes de croissance et différenciation ainsi que dans le mûrissement du fruit.

2. MATERIELS ET METHODES

A. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

1. PRINCIPE.

La lyse cellulaire du matériel végétal s'effectue à l'aide d'un détergent sur un échantillon broyé. Elle est suivie d'un traitement à la protéinase K permettant la dégradation des membranes et protéines. La séparation des acides nucléiques s'obtient après utilisation de solvants organiques précipitant les protéines et de NaCl éliminant les polysaccharides. De plus, les cellules végétales contenant beaucoup de nucléases, la présence d'EDTA, agent complexant du cofacteur (Mg⁺⁺) de nucléases, est requise dans toutes les solutions. Par la suite, un traitement à la RNAse dégradera l'ARN et l'ADN sera concentré par précipitation à l'éthanol. L'on obtient ainsi des fragments d'ADN d'environ 50 kb et 10 à 40 µg par gramme de poids frais (Ampe, 1990).

2. SOLUTIONS.

- Protéinase K : 10 mg/ml.
- RNAse : 10 mg/ml.
- Tampon S :

Tris HCl pH 8.5	100mM
NaCl	100mM
EDTA pH 8.0	50mM
SDS	2%

- TE 1X :

10/1 --> 10mM Tris (1M) / 1mM EDTA (0,2M) pH 8 1ml / 100ml 0,5ml / 100ml
- Phenol/chloroforme :

Dissoudre 250 g de phénol dans l'eau stérile. Y ajouter du Tris non ajusté, agiter et vérifier le pH. Lorsque l'on obtient un pH égal à 8, on retire le Tris non ajusté et

on le remplace par du Tris 1M pH 8.

Après agitation de cette solution, on prélève le Tris 1M pH 8 et on le remplace par du TE (1X).

Finalement, on enlève le TE et on le remplace par un volume de chloroforme égal à celui du phénol.

- Ethanol 70%.
- Ethanol 96%.
- Acétate de Na 3M

3. PROTOCOLE.

 La verrerie traitée au Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) est stérilisée à 180°C tandis que le matériel végétal est découpé, pesé et emballé dans de l'aluminium avant d'être stocké à -70°C.

N.B. L'on ne garde que la chair du fruit de la tomate.

L'on découpe les feuilles après 24 heures d'obscurité.

- On broye dans de l'azote liquide sans jamais découvrir le matériel afin d'éviter les hausses de température. Pour cette même raison, le pilon et le mortier ont été préalablement refroidis. Lorsque le matériel est réduit en poudre, on le transfère dans un tube que l'on peut stocker à -70°C.
- A chaque échantillon, on ajoute 20 ml de tampon S et 100 μl de protéinase K.
- On incube les tubes 2 heures à 65°C, en inversant délicatement tout les quarts d'heures.
- On ajoute ensuite 20 ml de phénol/chloroforme et l'on mélange le tout en inversant.
- On centrifuge 20 minutes à 2000 rpm afin de séparer les deux phases.
- On peut dès lors récupérer le surnageant (phase aqueuse) et le transférer dans un tube stérile auquel on a ajouté 0.6 volume d'isopropanol. 10 minutes après avoir mélangé les tubes, on reprend l'ADN précipité sur une pipette Pasteur à bout recourbé, on la trempe dans l'éthanol 70% puis dans 2 ml de TE 1X dans lequel on laisse l'ADN se dissoudre durant une nuit à 4°C.

Quantité d'agarose (% w/v)	Etendue de la séparation de molécules d'ADN linéaires (kb.)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Tableau 2.1. : Type de séparation lors de migration en fonction de la concentration en agarose.

1

- N.B.1.Si l'on ne sait pas récupérer l'ADN sur la pipette, il suffit de réaliser les opérations suivantes :
 - Centrifuger 10 minutes à 2000 rpm.
 - Eliminer le liquide sans prendre le culot et resuspendre ce dernier dans l'éthanol 70%.
 - Centrifuger à nouveau 10 minutes à 2000 rpm.
 - Eliminer le liquide et resuspendre le culot dans 2 ml de TE 1X durant une nuit à 4°C.
- Le lendemain, chaque échantillon est incubé une heure à 37°C après ajout de 5 μl de RNAse préalablement bouillie (15 minutes à 100°C).
- On précipite le matériel dans un mélange d'acétate de Na 3M (0.1 volume)/éthanol 96% (2 volumes) et on le récupère à l'aide d'une pipette Pasteur à bout recourbé avec laquelle on trempe à nouveau le matériel dans l'éthanol 70%.
- On termine en déliant dans du TE 1X durant une nuit à 4°C (Maniatis, 1989).
 - N.B.2. : Si l'ADN ne se dissout pas au delà de ce temps, on peut le chauffer progressivement de 50°C à 65°C. Si l'ADN ne peut être récupéré sur pipette Pasteur, on peut effectuer une série de centrifugations (N.B.1.).

4. VERIFICATION DE L'EXTRACTION.

L'électrophorèse nous permet de réaliser cette opération. En effet, l'ADN extrait doit être le plus intègre possible (c'est-à-dire de poids moléculaire élevé) si l'on désire l'utiliser dans une réaction d'amplification. On utilise ici un gel d'agarose 0.6% qui sépare des molécules d'ADN d'1 à 20 Kb (tableau 2.1.).

Le tampon de migration peut être de deux types :.

a. TAE 50X :

Tris 2M	242	g/l
Acétate Na 1M	82.03	g/l
EDTA 0.1M	37.20	g/I

A diluer dans l'eau.

Mettre à pH 7.8 avec l'acide acétique glacial.

b. TBE 10X :

		Tris base	108 g/l
		H ₃ BO ₃	55 g/l
		EDTA 0.2M pH 8	10 ml
A	diluer	dans l'eau.	

λ Hind III	λ Hind III EcoR I	Φ X174 Hae III
23,130	21,226	1,353
9,416	5,148	1,078
6,557	4,973	872
4,361	4,268	603
2,322	3,530	310
2,027	2,027	281
564	1,904	271
125	1,584	234
	1,375	194
	947	118
	831	72
	564	and the standard
	125	The other we have a stress

Tableau 2.2. : Marqueurs de taille (bases).

Avec le TAE, l'ampérage appliqué ne peut excéder 40mA; dès lors, la migration sera plus lente que dans le TBE

Chaque puit doit être rempli d'un même volume obtenu si nécessaire par ajout de tampon à l'échantillon.

De plus, une solution de bleu de bromophénol/glycérol 99% y est mélangée afin de colorer et d'alourdir l'échantilon.

Les résultats sont révélés par passage du gel dans un bain de bromure d'éthidium.

Bleu de Bromophénol : 25 mg/ 10 ml eau. Aliquoter 4 ml : 2 ml de bleu et 2 ml de glycérol 99%

Cette technique permet non seulement d'estimer la taille de l'ADN mais aussi sa concentration et ceci grâce à un marqueur de taille (tableau 2.2.) Dans ces expériences, le λ Hind III est utilisé comme marqueur de haut poids moléculaire et le Φ X174 Hae III comme marqueur de faible poids moléculaire. En connaissant la concentration du marqueur et la quantité déposée dans le puit, on détermine la valeur que représente chaque bande de migration. En comparant alors l'intensité de l'échantillon et le marqueur, on peut estimer la concentration d'ADN obtenu par extraction (Maniatis, 1989).

5. ESTIMATION DE LA CONCENTRATION PAR SPECTROPHOTOMETRIE.

La prise de densité optique à 260 nm de longueur d'onde nous donne une estimation de la concentration en acide nucléique dans l'échantillon sachant que 1 DO correspond à 0.05 mg/ml pour du DNA double brin, 0.04 mg/ml pour du DNA/RNA simple brin et 0.02 mg/ml pour des oligonucléotides simple brin (Maniatis, 1989).

La prise de densité optique à 280 nm de longueur d'onde nous permet d'établir un rapport de DO 260 nm/DO 280 nm qui devra être compris entre 1.7 et 2.0, toutes autres valeurs trahiront la présence de contaminants (protéines, traces de phénol...).

Enzymes	Tampon concentré 10X
Boehringer : isolée d'une eubactérie thermophile Thermus aquaticus BM.	 Tris-HCI 100mM MgCl₂ 15mM KCI 500mM Gélatine 1mM pH 8.3
Cetus : isolée d'une eubactérie thermophile Thermus aquaticus YT1.	- Tris-Cl 100mM - MgCl2 15mM - KCl 500mM - Gélatine 1% - pH 8.3
Promega : isolée d'une eubactérie thermophile Thermus aquaticus.	- Tris-HCI 100mM - KCI 500mM - Triton X-100 1% - pH 9
Ajout d'un échantillon de MgCl2 25mM. L'optimum de travail de la Taq étant de 1 à	4 mM de MgCl ₂ .

Tableau 2.3. : Taq polymérases et leur tampon.

B. AMPLIFICATION D'ADN

1. PRINCIPE.

Par action d'une ADN polymérase thermorésistante en présence d'ADN et de deux amorces constituées d'oligonucléotides, il est possible d'amplifier une séquence particulière d'ADN en réalisant une série de cycles de températures caractéristiques d'une dénaturation, hybridation et élongation.

2. PROTOCOLE.

- ADN génomique : 100 ng à 500 ng pour un gène à copie unique ou moins pour les gènes à copies multiples.
- Une unité de Taq polymérase pour 50 µl de réaction.
- Tampon 10X : 1/10 du volume final de réaction.
- Oligonucléotides (primers) : 1 µg de chaque.
- Mix contenant les quatres déoxynucléotides triphosphates 25 mM représentant 1/10 du volume final de réaction.
- Eau utilisée pour atteindre le volume final.
- Parafine recouvrant le volume de réaction afin d'éviter toute évaporation et donc perte de matériel.
- MgCl2 (s'il n'est pas contenu dans le tampon) : 1 à 2.5 mM.
- a. Réalisation d'une série de dilutions d'ADN génomique allant de 1 μg/μl à 1 ng/μl.
- b. Choix d'une Taq polymérase (tableau 2.3.).

Il s'agit d'une enzyme codée par une bactérie thermophile marine que l'on a clonée puis amplifié dans Eschérichia Coli.

- Taq polymérases testées : Boehringer Mannheim.
 - Cetus.
 - Proméga.
- c. Chacune de ces enzymes est accompagnée d'un tampon concentré 10X, de composition adaptée en vue d'une optimisation d'action de la Taq polymérase (Tableau 2.3.).

- d. Choix des oligonucléotides primers.
 - Tous ont été sélectionnés dans la séquence condante de la protéine (Ray, 1988) et vérifiés par deux programmes informatiques (Oligo 4 et primer).
 Ce dernier teste les primers sur toute la séquence, sur eux-même et entre eux afin d'établir s'ils hybrident spécifiquement à la région d'origine.
 Il vérifie le taux de G-C dans le primer choisi et donne la température d'hybridation de chacun.
 - Le choix étant fait, on les synthétise de façon classique (Hatinguais, 1986).
 Nos primers ont été synthétisés par la firme Eurogentec.
 - Les oligonucléotides commandés sont resuspendus dans 50 μl d'eau.
 On détermine leur concentration par prise de densité optique à 260 nm sachant qu'1 DO équivaut à 0.02 mg/ml et l'on prépare des solutions à 1 μg/μl.

3. CHOIX DES TEMPERATURES.

Cycle standard	: 1. Ajo	dénaturation : out de l'enzyn	93°C, ne.	6 minutes	
	2.	dénaturation hybridation	: 93°C, · X°C	1minute 2 minutes	35 cycles
		élongation	: 72°C,	2 minutes	00 090100
	3.	terminaison	: 72°C,	10 minutes.	

- La température de dénaturation fluctue entre 90 et 95°C.
 Elle doit être brève afin de ne pas détériorer l'enzyme.
 La première étape de dénaturation visant à éliminer les nucléases potentielles peut être plus longue car on ajoute l'enzyme par après.
- La température d'hybridation dépend des oligonucléotides sélectionnés et est calculée comme suit : 4 (C-G) + 2 (A-T) - 5°C.
 Elle se situe entre 40 et 60°C.
- La température d'élongation varie de 70 à 75°C, il s'agit de la température optimale de travail de la Tag polymérase.

Si l'on diminue la température d'hybridation par rapport à celle calculée, on favorise l'hybridation non spécifique des primers et l'on risque d'obtenir des bandes d'amplification annexes non attendues (Innis, 1990, Saiki, 1990).



1

In pUC18, the EcoRI site lies immediately downstream from P_{Iac} . In pUC19, the HindIII site lies immediately downstream from P_{Iac} .

Figure 2.1. : Carte du pUC18 (Maniatis, 1989)

4. CONTROLES D'AMPLIFICATION.

Chaque amplification est accompagnée de contrôles positif et négatif.

a. Contrôle négatif.

Seul l'ADN est absent dans cette réaction. Il permet de vérifier si les oligonucléotides ne s'amplifient pas sur eux- même (c'est-à-dire qu'ils s'utiliseraient comme matrice), ce qui interfererait avec la réaction normale.

b. Contrôle positif.

Il permet de vérifier si l'enzyme est valable. Il s'agit ici du clone pPE1 (Ray, 1988) amplifié selon les mêmes conditions de température que l'ensemble de l'expérience.

5. VERIFICATION DE L'AMPLIFICATION.

Par électrophorèse en agarose 1.2% à 1.5% dans un tampon TAE. On dépose 10 μ I d'échantillon amplifié. Les marqueurs utilisés sont le Φ X174 Hae III λ Hind III EcoB I.

C. CLONAGE

1. PRINCIPE.

Il s'agit d'insérer le fragment d'ADN amplifié par PCR dans un plasmide permettant la multiplication rapide et le stockage à long terme du matériel.

Le plasmide utilisé est un pUC 18 (figure 2.1.) :

Il se réplique à un taux plus élevé car ne possède pas le gène rop, contrôleur du nombre de copies.

Il présente un gène de résistance à l'ampiciline et un site multiple de clonage au sein d'une partie de l'opéron lactose codant le répresseur de l'opéron (Lac I) et la partie amino terminale de la β -galactosidase (Lac Z).

La souche bactérienne utilisée est une JM 101 :

- F' (tra D 36, pro AB⁺, lac I9 lac Z \triangle M 15)

- sup E, thi △ (lac-pro AB⁺) .

Sup E code pour un tR.N.A supresseur fort des mutations amber, il insère une glutamine lorsqu'il rencontre un UAG.

Lac Z Δ M 15 rend l'hôte accepteur de vecteur contenant des mutations amber. Elle possède également l'opéron lactose délété mais par α complémentation avec le pUC 18, la β -galactosidase est restaurée.

Cet opéron lactose sert à détecter la présence d'insert dans le plasmide . Sachant que l' isopropylthio- β -galactoside (IPTG) est un inducteur gratuit de cet opéron et que la β -galactosidase dégrade le galactose, on ajoute au milieu de culture type de l'IPTG et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal). Le X-gal étant dégradé en un produit coloré (bleu) par la β -galactosidase, il devient possible de dinstinguer les bactéries contenant un plasmide recombinant car l'insert disrupte le gène lac Z' et aucune β -galactosidase complète n'est produite, la colonie sera blanche.

Les colonies positives seront purifiées et stockées par étalement sur un milieu solide (LB Amp⁺) tandis qu'elles seront amplifiées en milieu liquide (LB Amp⁺) afin d'extraire le plasmide pour vérifier l'insert cloné (Maniatis, 1989).

2. PREPARATION DU PLASMIDE.

a. Linéarisation.

Elle s'effectue par digestion BamH I du pUC 18, car l'on désire cloner un insert se terminant par deux sites de restriction BamH I.

Protocole	:	-	1 μl Puc 18 (0.6 mg/ml) purifié en césium.	
		-	10 µl buffer concentré 10 fois.	
		-	78 µl eau.	
		-	2 μl enzyme (50 unités/μl).	
		-	100 µl	

Incuber une heure à 37°C (bain).

Tampon de digestion BamH I : -Tris-HCI 50mM -MgCl2 10mM -NaCI 100mM b. Déphosphorylation.

Il s'agit d'une étape d'excision des groupes 5' phosphate des extrêmités du plasmide linéaire afin d'éviter les religation du plasmide sur lui-même lors de la ligation entre l'ADN amplifié par PCR et le pUC 18.

On utilise une phosphatase alcaline intestinale de veau, protéine dimérique, comme enzyme car chaque monomère porte deux atomes de zinc essentiels pour l'activité de l'enzyme.

Généralement, on utilise une unité de phosphatase (1u/1 µl) pour 100 pmoles de résidus 5' phosphate. Or 2 µg de DNA 5 kb linéaire contient 1.4 pmole de résidus 5' phosphate. Donc, une unité de phosphatase pour 6 µg de pUC 18 est largement suffisante.

Protocole	:	- 1	00 µl de solution de linéarisation.
		-	10 µl de tampon concentré 10 fois.
			1 μl enzyme (1 unité/0.001 ml).
Incuber un	ne	heure	à 37°C (bain).

Tampon	de	déphosphorylation	:	-	Tris-Cl	pH	8.3	100	mM
				-	MgCl ₂			10	mM
				-	ZnCl ₂			10	mM

c. Purification du plasmide.

L' extraction d'ADN se réalise par utilisation de phénol/chloroforme et la concentration par précipitation à l'éthanol (Maniatis, 1989).

Protocole :

- On ajoute un égal volume de phénol/chloroforme (100 μl) au plasmide traité.
- On centrifuge 5 minutes à 8000 rpm.
- On reprend la phase aqueuse et on ajoute un égal volume (100 µl) de chloroforme.
- On centrifuge 5 minutes à 8000 rpm.
- On reprend la phase aqueuse et on précipite à l'éthanol : 2 volumes (200 μl) et NaCl 4 M : 0.05 volume (5 μl) à - 70°C durant 30 minutes.
- On centrifuge 5 minutes à 10000 rpm.

- On sèche le culot et on le resuspend dans 10 µl de TE 1X.

On détermine la concentration du plasmide par mesure de densité optique à 260 nm.

d. Vérifications.

d.1. La linéarité se vérifie par une électrophorèse :

```
- Tampon TAE.
```

- Agarose 0.8%.
- Puit 1 : 1 µl Puc 18 (0.6 mg/ml).

- 8 µl TAE 1X.

1 µl Bleu de bromophénol.

- Puits 2/3 : 1/3 μl λHind III.
 - 8/6 µl TAE 1X.
 - 1/1 µl Bleu de bromophénol.

On doit observer une seule bande de 2690 bp : taille du pUC 18.

d.2. La déphosphorylation se vérifie par une ligation sur lui-même.

- Ligation :

- 1 μl pUC 18 (0.1 mg/ml).
- 2 µl Tampon concentré 10 fois.
- 16 μl Eau.

- 1 µl T4 ADN ligase.
- 20 µl

Incuber 16 heures à 14°C.

Tampon de ligation	:	-Tris-Cl pH	8.3	500	mM
(concentré 10X)		-MgCl2		100	mM
		-Dithiothrei	tol	100	mM
		-B.S.A.		0.5	mg/ml

- Transformation : - A : 2 µl de ligation

- B: 5 µl

- C : 10 µl

- D: 5 µl de pUC 18 circulaire
- (10 pg/1 µl)

- E: 0 µl de ligation

On ajoute 0,1 ml de cellules compétentes JM 101. On incube 30 minutes dans la glace. On incube 45 secondes à 42°C. On ajoute 1 ml de tampon SOC.

Tampon SOC :	-Bacto-tryptone	20	g	
	-Bacto-yeast-extract	5	g	
	-NaCl	0.	5 g	dans un litre.

Secouer et ajouter 10 ml de KCl 250 mM au tampon SOC. Mettre à pH 7.

Autoclaver.

ET y ajouter 5 ml de MgCl₂ 2 M et 20 ml de glucose 1M. On incube 30 minutes à 37°C (bain) et 30 minutes dans l'étuve en agitant.

On étale 0.1 à 0.2 ml de chaque échantillon sur du milieu solide LB X-gal Amp. et on incube une nuit à 37°C (étuve).

Milieu LB X-gal Amp.	: -Bacto-trypton	ne 10 g/l	
	-Yeast extract	5 g/l	
	-NaCl	5 g/l	
	-NaOH 1N	2 ml	
	-Gélose (agar)	15 g	
Autoclaver.	Server in		
Et ajouter :	-Ampiciline	4 mg/ml :12.5	ml
	-X-gal	20 mg/ml : 1	ml
	-IPTG	100 mM : 3	μl

Le lendemain, il suffit de compter les colonies et d'établir les rapports de colonies bleues/blanches ainsi que le nombre de colonies obtenues par gramme de pUC18 (taux de transformation).

3. PREPARATION DE L'ADN AMPLIFIE.

a. Traitement "gene clean".

Il s'agit d'une méthode de purification d'ADN après séparation par électrophorèse.

- Electrophorèse.

On prépare un gel d'agarose préparatif d'1.5% permettant la séparation de molécules d'ADN linéaires comprises entre 200 et 3000 bp. Il s'agit d'un agarose très pur : Sigma type IV. On dépose 15 μ I d'amplification PCR par puit. On utilise le Φ X174 Hae III et le λ Hind III comme marqueurs. On applique 35 mA et 150 V pour une nuit de migration en tampon TAE.

- Purification de l'ADN

Le gene clean de "Bio 101" est une méthode utilisant du Nal 6 M pour dissoudre l'agarose et une matrice de silice (glassmilk) pour purifier l' ADN du bromure d'éthidium, de l'ARN, des protéines et autres contaminants. En effet, seul l'ADN se fixe sur cette matrice tandis que le New Wash élimine les particules libres.

Protocole :

- On extrait les bandes d'ADN du gel.
- On les pèse et l'on mutliplie le poids (mg) par 3 afin d'obtenir le volume (1 µl) de Nal à ajouter.
- On incube 15 minutes à 55°C en agitant toutes les 5 minutes jusqu'à dissolution complète de l'ADN
- On ajoute 5 μl de glassmilk pour 15 μl d'échantillon déposé sur gel et l'on vortexe.
- On incube 10 minutes à température ambiante en vortexant afin de mettre en contact l'ADN avec une surface maximale de matrice.
- On centrifuge 5 secondes à 10000 rpm.
- On élimine le surnageant et on lave le culot 3 fois au New Wash : en ajouter 0.5 ml et centrifuger 5 secondes à 10000 rpm.
- On élimine le surnageant et on resuspend dans 15 µl de TE 1X.
- On incube 5 secondes à 55°C afin de favoriser la dissolution de l'ADN dans le TE 1X.
- On centrifuge 30 minutes à 10000 rpm et on récupère le surnageant que l'on stocke à - 20°C.

Composition du New Wash concentré (Bio 101): - NaCl

- Tris

- EDTA

On mélange 14 ml de New Wash concentré avec 280 ml d'eau et 310 ml d'éthanol 100% et l'on adapte le pH à 7-8.5.

Il reste à vérifier la quantité extraite par électrophorèse ou mesure de densité optique à 260 nm.

Généralement le rendement est supérieur à 50%.



ligate and subclone into appropriate vector

original DNA

primer DNA new DNA PCR DNA

Figure 2.2. : Méthode de clonage adaptée aux produits PCR (Current protocols, 1992) 4. LIGATION.

a. Méthode classique.

Il s'agit d'introduire le fragment d'ADN amplifié par PCR dans le pUC 18 grâce à une T4 ADN ligase.

Protocole	: - 2 μl pUC 18 (100 ng/1 μl)
	 - 2 μl Tampon concentré 10 fois. - 3/5/8/0 μl d'ADN purifié
	-12/10/7/15 μl d'eau.
	- 1 μl T4 D.N.A. ligase (1 unité/1 μl).
	-20 μl

Incuber une nuit (16 heures) à 14°C. (MANIATIS, 1989).

b. Méthode spécifique aux produits PCR

Elle s'applique aux molécules linéaires se terminant par des sites de restriction incomplets (demi site).

On obsèrve une adénine terminale dans le cas du site BamH I (figure 2.2.). L'action d'une ADN polymérase (fragment klenow) élimine cette base excédentaire, tandis qu'une T4 DNA polynucléotide kinase phosphoryle les extrémités 5' rendant possible la formation de lien phosphodiester entre les extrémités 5' et 3' par utilisation d'une T4 D.N.A. ligase. Les concatémères ainsi obtenus seront digérés par l'enzyme BamH I et sous-clonés de façon classique dans un pUC 18 (Ausubel, 1992).

Protocole :

Extraction

- Après amplification, on retire la parafine recouvrant l'eppendorf contenant la réaction d'amplification (80 μl).
- On ajoute un égal volume de phénol/chloroforme.
- On centrifuge 5 minutes à 8000 rpm.
- On récupère la phase aqueuse et on y ajoute 2 volumes d'éthanol et 1/20 de volume de NaCl 4 M.
- On incube 30 minutes à -70°C.
- On centrifuge 5 minutes à 10000 rpm.
- On sèche et on resuspend dans 25 µl de TE 1X afin d'obtenir une solution 0.2 mg/ml.

- Ligation

- 5 μl ADN (0.2 μg/μl)
- 1 µl tampon concentré 10 fois de la T4 ADN ligase.
- 1 μl ATP 1mM.
- 1 µl dNTP 2mM.
- 0.5 μl ADN polymérase (fragment klenow)(2 u/1 μl).
- 0.1 μl T4 kinase (10 u/1 μl).
- 1.4 μl T4 ligase (1 u/1 μl).

- 10 µl

Incuber une nuit (16 heures) à 14°C.

- Digestion BamH I

- 10 µl ligation.

- 5 μl enzyme (10 u/1 μl).
- 3 µl tampon concentré 10 fois.
- 12 µl eau.

- 30 µl

Incuber 5 heures à 37°C.

5. TRANSFORMATION

a. Principe.

Il s'agit d'introduire un plasmide recombinant dans une bactérie lui permettant de se multiplier à volonté. On sélectionne les colonies en utilisant un milieu LB X-gal Amp.

b. Préparation des cellules compétentes.

Les cellules souches (E. Coli)sont stockées à -20°C dans du DMSO.

- On mélange 0.02 ml de cellules souches avec 50 ml de milieu LB liquide et on incube une nuit à 37°C en agitant.
- On reprend 1 ml de cette culture dans 50 ml de LB liquide, on incube à 37°C en agitant et on suit la densité optique à 650 nm. Lorsqu'elle atteint 0.4, on centrifuge 10 minutes à 4000 rpm.
- On resuspend le culot dans 20 ml de tampon de compétence Coli.
- On incube 30 minutes dans la glace et on centrifuge 10 minutes à 4000 rpm.
- On resuspend dans 5 ml de tampon de compétence Coli.
- Les cellules sont aliquotées en 500 µl et stockée à -70°C.

Milieu	LB	:- bacto tryptone	10 g/l
		- Yeast extract	5 g/l
		- NaCl	5 g/l
	- NaOH 1M	2 ml	
		- Gélose (agar)	15 g/l

Tampon Coli :	-	glycérol	15%
	-	Tris-Cl	0.5 M pH 7.5
	-	CaCl ₂	1 M

- c. Protocole.
- 5 µl de ligation.
 - 10 µl
 - 0 μΙ

5 µl de pUC 18 circulaire (10 pg/1 µl).

- On y ajoute 100 µl de cellules compétentes : JM 101.
- On incube 30 minutes dans la glace.
- On applique un choc thermique de 45 secondes à 42°C afin d'adsorber le plasmide dans la bactérie.
- On ajoute 1 ml de tampon SOC.
- On incube 30 minutes à 37°C (bain) et 30 minutes à 37°C dans l'étuve en agitant.
- On étale 5 fois 200 µl (A,B,C,D,E) sur des boîtes de LB X-gal Amp. préalablement séchées.
 On les incube une nuit à 37°C en étuve.

Le lendemain, on compte les colonies et on établit les rapports de transformation.

6. EXTRACTION D'A.D.N. PLASMIDIQUE (MINIPREP).

a. Principe.

Il s'agit d'une méthode d'extraction permettant la vérification du clonage par digestion de l'ADN plasmidique. Elle implique une purification sur milieu solide LB Amp⁺ et une amplification sur un même milieu liquide après sélection des colonies blanches.

b. Protocole.

 On prépare un milieu solide LB Amp⁺ sur lequel on strie la colonie blanche reprise et on l'amplifie dans 2 ml de LB Amp⁺ liquide.

Milieu L Amp⁺ : milieu LB autoclavé et mélangé à 25 ml d' ampiciline 4 mg/ml pour un litre de LB.

- On incube le tout à 37°C.
- Les colonies sur milieu solide sont stockées à 4°C et repurifiées tout les mois sur un nouveau milieu.
- Le milieu liquide est centrifugé 2 minutes à 10000 rpm.
- On élimine le surnageant en utilisant une pompe à vide et on resuspend le culot dans 100 µl de solution l en vortexant.

Solution 1 :

-	Glucose					2 g	
-	EDT	A	0.2	M		10 ml	
-	Tris	1	Μ	рН	8	5 ml	

200 ml

L'EDTA complexe le Mg2+, cofacteur des nucléases.

- On y ajoute 200 µl de solution II et 150 µl de solution III en agitant

Solution II :

10 ml
10 ml
100 ml

Solution III :

Acétat	e de	K 3	М		117
Acide	acéti	que	рН	4.8	

17.6 g 46 ml 400 ml afin de précipiter, par présence de SDS et d'augmentation des sels et du pH, l'ADN, ARN linéaire et les protéines tandis que l'ADN circulaire reste soluble.

- On centrifuge 8 minutes à 14000 rpm et on récupère le surnageant.
- On réalise une extraction phénol/chloroforme par ajout d'un égal volume auquel on applique un coup de vortex.
- On centrifuge 5 minutes à 8000 rpm et on récupère le surnageant.
- On réalise une précipitation à l'éthanol : 2 volumes et NaCl 4M : 1/20 de volume.
- On centrifuge 8 minutes à 14000 rpm, on sèche les culots et on les resuspend dans 100 µl de TE 1X.

L'ADN extrait, on en digère 1 μ g par 10 unités d'enzyme durant deux heures minimum afin de vérifier la taille du plasmide et de l'insert.

D. SOUTHERN

1. PRINCIPE.

Dans ce travail, cette technique se base sur une hybridation ADN-ADN en vue de vérifier le clonage et les amplifications PCR. Elle implique une étape de transfert d'ADN sur une membrane de Nylon chargée positivement par passage de solvant à travers le gel, suivie d'une préhybridation éliminant les sites de fixation aspécifiques et d'une hybridation avec une sonde qui n'est autre que le second ADN marqué par nick "translation." Les résultats sont obtenus par autoradiographie de la membrane après lavages en conditions adéquates (Maniatis, 1989).

2. METHODE.

a. Le transfert d'ADN

Cette étape se réalise après séparation de l'ADN par électrophorèse en tampon TAE dans un gel d'agarose 1.5% pour une vérification d'amplification P.C.R. et 1% pour une vérification de clonage. L'électrophorèse se fait à 35 mA et 150 V pendant une nuit de migration. Le lendemain, on découpe le gel et on établit des repères de migration d'ADN.

- On dénature le gel 1 heure dans une solution I. Solution I : - NaOH 20 g/l. - NaCI 87.5 g/l.
- On neutralise le gel 2 fois durant 30 minutes dans une solution II. Solution II : - Tris 60.5 g/l. - NaCl 175 g/l pH 7.
- On rince le gel 20 minutes à 1 heure dans une solution de 20X SSC. 20X SSC : - NaCl 175 g/l. - Citrate Na 88 g/l.

On prépare le transfert comme suit :

- On remplit un récipient de 20X SSC.

- On y dépose une plaque de verre couverte de 3 papiers (23 cm)
 Watman 3M imbibés de 20X SSC et plongeant dans le récipient.
 Cette opération doit se faire en évitant les bulles d'air
- On dépose le gel, ADN vers le haut, sur le papier 3M et on le recouvre d'une membrane de Nylon (Hybond-N chargé positivement. Amersham.) et de 3 papiers 3M imbibés de 20X SSC en évitant les bulles.
- On recouvre le tout de papier absorbant et d'une plaque de verre afin de bien presser le tout.
- Le lendemain, on démonte le transfert et on marque la membrane des mêmes repères que le gel.
- On la dépose, ADN vers le haut, sur 3 papiers 3M imbibés de NaOH 0.4M afin de fixer l'ADN pendant 20 minutes.
- On la trempe dans du 5X SSC et on l'emballe dans du film alimentaire afin de la garder à 4°C en attendant la préhybridation (Maniatis, 1989).

b. La préhybridation.

Elle se réalise pendant 3 heures minimum en conditions plus ou moins stringeantes selon l'expérience (Maniatis, 1989).

Solution stringeante : 65°C/3X SSC.

- 20X SSC		4,5	ml
- Denhardt	100X	1,5	ml
- SDS 10%		0,3	ml
- Eau		23,38	ml

On la chauffe à 65°C et on ajoute 320 μ l d'ADN de sperme de hareng bouilli 5 minutes à 100°C.

Solution moins stringeante : 65°C/6X SSC.

-20X SSC		9	ml
-Denhardt 1	00X	1,5	ml
-SDS 10%		1,5	ml
-Eau		17,68	ml

On la chauffe à 65°C et on ajoute 320 µl d'ADN de sperme de hareng bouilli 5 minutes à 100°C.

Denhardt 100X :	-Ficoll	20	g/I
	-Polyvinylpyrolidone	20	g/l
Carl Carlo	-BSA	20	g/I

c. L' hybridation.

Elle se réalise dans les mêmes conditions que la préhybridation en ajoutant la sonde radioactive.

d. Préparation de la sonde : par "Nick Translation".

Cette technique utilise une ADN polymérase I d' E. Coli qui ajoute un nucléotide lorsqu'elle rencontre un 3' hydroxyl terminal créé lors d'une brèche causée par une DNAse et entretenue par l'activité exonucléase 5'->3' de la polymérase I (elle enlève un nucléotide du côté 5' de la brèche). L'élimination côté 5' et l'addition simultanée côté 3' résultent en un mouvement de le brèche le long de l'ADN en remplaçant les nucléotides par d'autre dont un radioactif (Maniatis, 1989.).

Protocole :	- 5 µl Solution A2 (Kit BRL	.)	
	- 1 μg ADN		
	- X µl Eau		
	- 5 µl Enzyme (1u/1µl)		
	- 5 µl dCTP radioactif.		
	- 45 µl		
On incube 1 h	eure à 14°C.		
On stoppe la	réaction en ajoutant 5 µl de	solution D contena	ant de l'EDTA.
Solution A2 :	- Tampon 10X concentré :	-Tris-CL pH 5	0.5 M
		-MgSO4	0.1 M
		-Dithiothreitol	1 mM
		-BSA	0.5 mg/ml.
	- dNTP 20 mM (sans le dCT	'P)	
	- DNAse pancréatique (1 m et le NaCl 0.15 M.	ng/ml) dans le gly	cérol 50%

Dans les deux cas, la sonde est purifiée par passage sur colonne de chromatographie : Séphadex G50.

Il s'agit d'un gel de dextran très stable sauf en milieu très acide et en présence d'un oxydant très puissant, présentant des grains de 0.05 à 0.15 mm de diamètre. Les molécules de taille supérieure aux plus gros pores ne peuvent pénétrer dans les grains et vont donc être éluées (TE 1X pH 8) de la colonne très rapidement tandis que les plus petites passeront plus tardivement. Nous obtenons donc une séparation selon la taille des oligonucléotides marqués.

On mesure la radioactivité de chaque fraction (3 gouttes/tube) récupérée afin de détecter la sonde et le dCTP radioactif non incorporé.

Les fractions correspondant au premier pic de radioactivité (la sonde) sont récupérées et bouillies 5 minutes à 100°C puis ajoutées à la solution d'hybridation et on laisse hybrider une nuit (16 heures).

e. La révélation.

Le lendemain, on lave la membrane selon le procédé suivant :

- Premier lavage : on incube deux fois 15 minutes à 65°C dans du 2X SSC.
- Second lavage : on incube 30 minutes puis 15 minutes à 65°C dans du 2X SSC, 0.1% SDS.
- Troisième lavage : on incube 15 minutes à 65°C dans du 0.2X SSC.
- On élimine le liquide et on emballe la membrane dans du film alimentaire.
- On place la membrane en autoradiagraphie à -70°C avec un film X-ray kodak pendant un temps déterminé dans une cassette.



Figure 2.3. : Carte de λ ZAP (Maniatis, 1989).



Figure 2.4. : Carte de λ Charon 35 (Maniatis, 1989).

E. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ARABIDOPSIS THALIANIA.

1. PRINCIPE.

Il s'agit de détecter des clones chez cette plante peu évoluée par hybridation avec une sonde d'ADN afin de savoir si un gène de pectine méthyl estérase y est présent.

Cette technique nécessite un titrage de la banque, un transfert des plages de lyse sur une membrane de Nylon suivi d'une préhybridation et d'une hybridation avec la sonde cDNA de pectine méthyl estérase.

2. LE TITRAGE DES BANQUES.

a. Banque cDNA(Stratagème)

Il s'agit d'une banque construite dans λ ZAP (au site EcoR I) qui est un phage possédant un site multiple de clonage dans lac Z' et les signaux nécessaires à son excision sous forme de plasmide par utilisation d'un phage helper ainsi que la résistance à l'ampiciline. (Figure 2.3.)

Le vecteur hôte est une bactérie XL-1 blue :

- rk⁻ : elle ne peut restreindre l'ADN inséré mais peut le modifier.
- Rec A⁻ : elle ne permet pas la croissance lytique.
- F' pro AB⁺ lac^q lac Z delta M 15 : elle code le pili nécessaire à l'infection par le phage λ ZAP et une partie de l'opéron lactose intervenant dans l' α -complémentation de la β -galacosidase.
- Sup E, hsdR (rk⁻) : elle permet la croissance de phages présentant des mutations amber.

On peut y insérer jusqu'à 10 kb de cDNA (Stratagème).

b. Banque génomique.

Il s'agit d'une banque construite dans λ Charon 35 (figure 2.4.) qui est un phage possédant un site multiple de clonage dans lac Z' et un statut red-gam⁺ qu'il soit recombinant ou non ; cela lui permet de croître dans un hôte rec A⁻ tel LE 392 :

- Sup E, sup F : elle accepte les vecteurs portant des mutations amber.
- Hsd R (rk⁻) : elle peut modifier les sites EcoK de l'ADN inséré mais ne peut les restreindre.

On peut y insérer jusqu'à 21 kb d'ADN génomique. (Maniatis).

c. Protocole.

- Amplification des cellules compétentes.
 - * XL-1 blue :
 - On étale 0.1ml de cellules souches contenues dans le DMSO sur un milieu solide LB tétracycline (LB + 2 mg tétracycline) et on incube un nuit à 37°C.
 - On isole une colonie que l'on strie sur un milieu solide LB tétracycline et on incube une nuit à 37°C.
 - On amplifie une de ces colonies dans 50 ml de milieu liquide LB
 + 0.1 ml de tétracycline + 0.5 ml de maltose 20%
 et on incube une nuit à 37°C en agitant.
 - On centrifuge 10 minutes à 4000 rpm et on resuspend dans 1/10 de volume (5 ml) de MgSO4 100 mM.
 On stocke à 4°C une semaine grand maximum.
 - * LE 392 :
 - On étale 0.1 ml de cellules souches contenues dans le DMSO sur un milieu solide LB et on incube une nuit à 37°C.
 - On isole une colonie que l'on strie sur une milieu solide LB et on incube une nuit à 37°C.
 - On amplifie une de ces colonies dans 50 ml de milieu liquide LB + 0.5 ml de maltose 20% et on incube une nuit à 37°C en agitant.
 - On centrifuge 10 minutes à 4000 rpm et on resuspend dans 1/10 de volume (5 ml) de MgSO4 100 mM.
 On stocke à 4°C une semaine grand maximum.
- Dilutions des phages en tampons SM et SM + 0.1% de gélatine.

Tampon SM :	-	Tris pH 7.4	20 mM	
	-	NaCl	100 mM	
	-	MgSO4	10 mM	

- On réalise des dilutions de 10 à 107
- On incube 1 μl de dilution et 0.1 ml de cellules compétentes15 minutes à 37°C afin d'adsorber les phages.
- On ajoute 4 ml de top agar (LB + 0.7% agar), on vortexe et on étale sur un milieu solide LB.
- On incube une nuit à 37°C.

Le lendemain, on compte les plages de lyse en fonction des dilutions et on établit le titre de la banque.

3. LE CRIBLAGE DES BANQUES.

a. Le transfert.

- A : On incube 1 μl de banque génomique avec 3 μl de tampon SM et 2 ml de cellules LE 392 afin d'obtenir environt 20000 plages de lyse.
- B : On incube 9 μ l de dilution 100 dans 3 μ l de tampon SM + 0.1% gélatine et 2 ml de cellules XL-1 blue afin d'obtenir environt 35000 plages de lyse.

On suit le même protocole que pour le titrage mais on ajoute 30 ml de top agar pour couvrir une boîte LB de 23 cm de côté.

Après 4 heures de croissance à 37°C pour λ Zap et une nuit pour λ Charon 35, on incube 2 heures à 4°C.

- On dépose la membrane de nylon et on transfère 5 minutes en milieu stérile.
- On dénature la membrane 2 minutes dans une solution I. Solution I : -NaCI 1.5 M
 - -NaOH 0.5 M
- On neutralise la membrane 5 minutes dans une solution II. Solution II : -NaCI 1.5 M

-Tris-Cl 0.5 MpH 8

- On rince la membrane 30 secondes dans une solution III. Solution III : -Tris-Cl 0.2 M pH 7.5 -2X SSC
- On fixe l'ADN sous U.V. 5 minutes et on stocke la membrane à 4°C emballée dans un film alimentaire.

b. La préhybridation.

Elle se réalise en 5X SSC à 37°C en ajoutant 150 ml de la solution suivante :

- Formamide 40%
- SSC 5X
- SDS 0.05%
- Denhardt 5X
- ADN de sperme de hareng 0.1 mg/ml

La formamide est désionisé 3 heures avec 5 g/100 ml de résine échangeuse d'ions (amberlite MB-3) à température ambiante. Il est filtré et autoclavé.

La solution est, portée 10 minutes à 82°C puis ajoutée à la membrane pendant 3 heures minimum (Hilson, 1986).

c. L'hybridation.

Elle se réalise dans les mêmes conditions en ajoutant la sonde avant de porter à 82°C.

Cette sonde (pPE1) est marquée par nick translation et purifiée par passage sur colonne de séphadex G50.

- 5 µl Solution A2

- 2,7 μl A.D.N. (375 ng/1 μl)

- 27,3 µl Eau

- 5 µl Enzyme

- 5 µl dCTP radioactif

- 45 µl

Incuber 1 heure à 14°C et ajouter 5 µl de solution D.

d. Révélation.

Après une nuit d'hybridation, on lave les membranes :

- Deux fois 15 minutes à 37°C dans du SDS 0.2%, 2X SSC.

- 30 minutes à 37°C dans une même solution.

On met en autoradiographie une nuit et deux jours (Hilson, 1986).

e. Purification des clones hybridant.

On reprend les clones hybridant sur les deux membranes obtenues pour chaque étalement et on leur ajoute 0.5 ml de tampon SM ou SM + 0.1% de gélatine et 3/1000 de chloroforme.

On refait un étalement classique sur petite boîte, et on hybride les deux nouvelles membranes avec la même sonde dans les mêmes conditions.

On reprend une deuxième fois le clone présentant le spot le plus intense par boîte et on refait un étalement classique. Les clones isolés pourront alors être étudés.

DEMARCHE SUIVIE

- 1. Extraction d'ADN. Vérification des couples d'amorces choisis avec :
 - primer ou oligo 4 (logiciels testant la formation de duplex),
 - une comparaison des séquences protéiques de différentes PME (PME1 LYCES, PME2 LYCES, PME ASPTU, PME ERWCH).
 - un alignement multiple de ces mêmes séguences.

Amplification PCR ----> Vérification par hybridation southern utilisant un fragment pPE1 comme sonde après digestion Pst 1.

Clonage : - Ligation des produits entre eux,

- Digestion BamH I,
- Ligation dans un pUC18.

Vérification par - extraction de l'ADN plasmidique (miniprep) et digestion BamH I.

- hybridation southern utilisant le produit d'amplification, ayant servi au clonage, comme sonde.
- 2. Criblage de banques d'Arabidopsis thaliana avec un fragment de pPE1, obtenu après digestion Pst 1, comme sonde.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.

A. PRODUCTION DE SONDES GENOMIQUES DE P.M.E.

En partant d'une séquence cDNA de pectine méthyl estérase (PME2_LYCES isolée par Ray en 1988) nous avons choisi deux couples d'amorces que l'on a testés par la suite à l'aide de deux logiciels (Oligo 4 et Primer).

Nous avons alors effectué une série d'amplifications PCR sur ADN génomique de pommes de terre et de tomates afin de produire des sondes génomiques de PME chez deux Solanaceae.

Le but de cette étape est de fournir des outils d'étude des PME et de rechercher le nombre de gènes, allèles de PME existant chez la tomate et la pomme de terre.

1. OBTENTION D'ADN GENOMIQUE.

Nous avons réalisé une extraction classique (matériels et méthodes : 13-16) d'ADN génomique de tomate et de pomme de terre.

and the second	Quantité ADN (g)	Densite 260 nm	é Optique 280 nm	Concentration (mg/ml)	Rapport (260/280)	Quantité ADN(µg)/ g poids frais.
	Tomate*:					
	Fruit 1 5	0.061	0.039	0.59	1.64	236
	2 2,5	0.051	0.035	0.49	1.53	294
	Contrôle	0.002	0.003			
	Feuille :					
	Trend 2	0.025	0.017	0.22	1.47	330
	Recento 2	0.013	0.007	0.1	2	100
	Capello 2	0.017	0.011	0.14	1.56	210
	Punch 2	0.056	0.035	0.53	1.6	795
	Pomme de ter	rre :			1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	
	Feuille :					
	Charlotte 4	0.047	0.027	0.44	1.76	330
	Rosabelle 4	0.052	0.037	0.49	1.4	245
	Contrôle	0.003	0.002		12	

Tableau 3.1. : Prise de densité optique de l'ADN extrait.

*La variétié de tomate est inconnue (elle provient du commerce).

Pme2.L HL

Pme2,L LYDYSDIKLLFVYVTRHL

2, L TPNDEULRPGLGKMPSWUSSRDRKLMESSGKDIGANAUUAKDGTGKYRTLAEAUAAAPDK Er LIIAASUHQAQAATTYNAVUSKSSSDGKTFKTIADAIASAPAGSTPFUILIKNGVYNERL 2,L SKTRYVIYUKRGTYKENUEUSSRKMNLMIIGDGMYATIITGSLNUUDGSTTFHSATLAAU ell calarantan ar mantallar and adar E_EP_TITRNNLLLKGESRNGAUIAAATAAGTLKSDGSKNGT--AGSSTITISAKDFSAQSL-TI 90 - 100 2,L GKGFILQDICIONTAGPAK---HOAVALRV--GADKSVINRCRIDAYQDTLYAHSQRQFY e_Er RHDFDFPANQAKSDSDSSKIKDTQAVALYVTKSGDRAYFKDVSLVGYQDTLYVSGGRSFF 150 160 e2,L QSSYUTGTIDFIFGNAAUUFQKCQLUARKPGKYQQNMUT---AQGRTDPNQATGTSIQFC e_Er_SDCRISGTVDFIFGDGTALFNNCDLUSRYRADVKSGNUSGYLTAPSTNINOKYGLUITNS 270 280 e2.L DITASPOLKPUUKEFPTYLGRPUKKYSRTUUMESSLGGLIOPSGUAEUHGDFALKTLYYG e_Er_RVIRESDSUP-AKSYG--LGRPWHPTTTFSDGRYADPNAIGQTUFLNTSMDNHIYGWDKM

> Figure 3.1. : Comparaisons de séquences protéiques. a. PME 2_LYCES/PME 1_LYCES. b. PME 2_LYCES/PME_ASPTU. c. PME 2_LYCES/PME_ERWCH.

IIANAUUAQO GTGDYQTLAE AUAAAPOKSK TRYUIYUKRG TYKENUEURS
 NKEFPTYLGR PUKEYSRTUU MESYLGGLIN PAGUAEUDGD FALKTLYYGE
 FMNGKUGADM SUINRCRIDA YQDTLYAHSQ RQFYRDDYUT GTUDFIFGGA
 AUUKNKCOLU ARKPGKYOON MUTAOGRTOP NOATGTSIOF CNIIASODLE
 RPUMIUGDGM YATTITGSLN UVEGSTTFRS ATLAAUGQGT LLQDICIQNT
 AGPARDQAUA LRUKUPGYHU ITDPAKAMPF TUAKLIQGGS ULRSTGUAYU
 DGLYD

MINGTHLDEL ISRAKUALAM LASUTTPHDE ULRPGLGKMP SWUSSRDRKL 1 51 MESSGKDIGA NAVVAKOGTG KYRTLAEAVA AAPOKSKTRY VIYVKRGTYK 101 ENVEVSSRKM NLMIIGDGMY ATTITGSLNV VDGSTTFHSA TLARVGKGFI 151 LODICIONTA GPAKHOAVAL RVGADKSVIN RCRIDAYODT LYAHSOROFY 201 QSSYUTGTID FIFGNRAUUF QKCQLUARKP GKYQQHMUTA QGRTDPNQAT GTSIOFCDII ASPOLKPUUK EFPTYLGRPW KKYSRTUUME SSLGGLIDPS 251 301 GUREUHGDFA LKTLYYGEFM NNGPGAGTSK RUKUPGYHUI TDPREAMSFT 351 VAKLIOGGSW LRSTDVAYVD GLYDYSDIKL LFVYVTRHI

MUKSILASUL FHATALAÄSH MTAPSGAIUU AKSGGDYDTI SAAUDALSII
 STETQTIFIE EGSYDEQUYI PALSGKLIUY GQTEDTTTYT SNLUNITHAI
 ALADUDNDDE TATLRNYAEG SAIYNLNIAN TCGQACHQAL AUSAYASEQG
 YYACQFTGYQ DTLLAETGYQ UYAGTYIEGA UDFIFGQHAR AWFHECDIRU
 LEGPSSASIT ANGRSSESDD SYYUIHKSTU AAADGNDUSS GTYYLGRPUS
 QYARUCFQKT SMTDUINHLG UTEUSTSTPN TENUTFVEYG NTGTGAEGPR
 ANFSSELTEP ITISULLGSD WEDWUDISYI N

NLKTISGTLA LSLIIAASVH QAQAATTYNA UVSKSSSDGK TFKTIADAIA 1 SAPAGSTPFU ILIKNGUYNE RLTITRNNLL LKGESRNGAU IAAATAAGTL 51 KSDGSKWGTA GSSTITISAK DFSAQSLTIR NDFDFPANQA KSDSDSSKIK 101 DTOAUALYUT KSGDRAYFKD USLUGYODTL YUSGGRSFFS DCRISGTUDF 151 IFGDGTALFN NCDLUSRYRA DVKSGNUSGY LTAPSTNINQ KYGLVITNSR 201 251 UIRESDSUPA KSYGLGRPUH PTTTFSDGRY ADPNAIGQTU FLNTSMDNHI 301 YGUDKMSGKD KNGNTIUFNP EDSRFFEYKS YGAGAAUSKD RRQLTDAQAA 351 EYTOSKULGD WTPTLP

Figure 3.2. : Séquences protéiques de PME. a. PME 1_LYCES. b. PME 2_LYCES. c. PME_ASPTU. d. PME_ERWCH.


Photo 1 : Vérification de l'intégrité de l'ADN extrait par électrophorèse.

- Puits : 1. Charlotte échantillon 1
 - 2. Charlotte échantillon 2
 - 3. Rosabelle
 - 4. Recento
 - 5. Capello échantillon 1
 - 6. Capello échantillon 2
 - 7. Trend échantillon 1
 - 8. Trend échantillon 2
 - 9. Punch échantillon 1
 - 10. Punch échantillon 2
 - 11. λ Hind III (2 μ I)



Photo 2 : Vérification de l'intégrité de l'ADN extrait par électrophorèse. Puits : 1. λ Hind III (1 μ I)

- 2. Tomate 1
- 3. Tomate 2

L'état d'intégrité de l'ADN (taille) a été vérifié par électrophorèse TAE sur gel d'agarose 0.6 %.

On dépose 20 µl d'ADN dans 30 µl final (obtenu par ajout de TAE) par puit On applique 35 mA et 150 V pour une nuit de migration (photos 1 et 2).

On obsèrve bien une seule bande majeure au-dessus de la taille 23,130 b., ce qui signifie que l'ADN extrait est intègre.

2. CHOIX DES PRIMERS.

Nous avons sélectionné deux couples d'amorces à partir de la séquence cDNA de PME2_LYCES publiée par Ray en 1988 (figure 1.17.), chacun se situant dans la portion codante de la pectine méthyl estérase (PME) mature.

De plus, nous avons déterminé le taux d'homologies protéiques entre PME végétales, fongique et bactérienne et nous avons finalement effectué un alignement multiple pour détecter les portions de séquences protéiques conservées, tout ceci afin de mieux expliciter les résultats d'amplification obtenus sur ADN génomique avec les deux couples d'amorces.

a. Comparaisons de séquences.

Il s'agit d'une comparaison des séquences protéiques effectuée avec le logiciel GCG. Ce dernier a comparé la séquence protéique de PME2_LYCES publiée par Ray (1988) avec les 26706 séquences (swissprot.) protéiques qu'il détient à ce jour (Août 1992). Il utilise l'algorithme de Pearson et Lipman pour travailler (figure 3.1.).

- PME 2_LYCES correspond à une isoenzyme de PME isolée chez la tomate par Ray, 1988.
- PME 1_LYCES correspond à une autre isoenzyme de PME isolée chez la tomate par Markovic, 1986.
- PME-ASPTU correspond à un précurseur de PME isolé chez Aspergillus tubigensis (champignon) par Khanh, 1991. Il intervient lors du pourissement des tissus végétaux.
- PME-ERWCH correspond à un précurseur de PME isolé chez Erwinia chrysanthemi (entérobactérie anaérobie facultative) par Plastow, 1988. Il intervient également lors du pourissement des tissus végétaux. (figure 3.2.)

Worksheet2 Chart 1

pectine methyl esterases m = 50



Worksheet2 Chart 1

pectine methyl esterases m=500



Figure 3.4. : Coefficients de corrélation obtenus après comparaison des quatres séquences (m=500)

1 1 P 2 2 P 3 3 P 4 4 P	ME1_LYCES,SW ME2_LYCES,SW PME_ASPTU,SW ME_ERWCH,SW			sequence.simon				
	10	20	30	40	50	60	70	80
	+	+	+	+	+	+	+	+
1						A N A V V A (DGTGDYQTL	AEAVA
2 MINGII	NLDELISHAK	VALAMLASVI	IPNDEVLRPG	LGKMPSWVSS	AATALAASPM		(DGIGKYHIL)	AEAVA
4 MLK	TISGTLALSL	IIAASVHQAQ	AATTYNAVVS	KSSSDGKTFK	TIADALASAP	AGSTPFVILI	(NGVYNERLT	TRNN
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	90	100	110	120	130	140	150	160
	+	+	+	+	+	+	+	+
1 A A P D K	SKIHYVIYVK SKTDVVIVVV	HGIYKENVEV	A SINKE FIPTYL	GHPWKEYSHI	V V MESYLGGL	- I NPAGWAEWI	G D F A L K T L Y	YGEF-
3 A I S T T	STETOTIFIE	FGSYDEQVYI	PALSGKLIVY	GOTEDTTYT	SNIVNITHAL	ALADVDNDDE	ATIBNYAFG	SALVN
4 L L L K G	ESRNGAVIAA	ATAAGTLKSD	GSKWGTAGSS	TITISAKDES	AQSLTIRNDE	DFPANQAKSDS	SDSSKIKDTQ	AVALY
	170	180	190	200	210	220	230	240
1	+	+ KVGADMSVIN		TTI VAHSORO	FVBDDVVTGT	+ VDELEGGAAVI	HKNKCOLVAR	KPGKY
2 GPAKH	QA VAL	RVGADKSVIN	RCRIDAYO	DTLYAHSORO	FYQSSYVTGT	IDFIFGNAAV	FAKCALVAR	KPGKY-
3 L N I A N	TCGQACHQAL	AVSAYASEQG	YYACQFTGYQ	DTLLAETGYQ	VYAGTYIEGA	VDFIFGQHAR	WFHECDIRV	LEGP
4 V T K S G	DRAYFKDV		SLVGYQ	DTLYVSGGRS	FFSDCRISGT	VDFIFGDGTA	FNNCDLVSR	YRADVK
	250	260	270	280	290	300	310	320
	+	+	+	+	+	+	+	+
1 00	NMVTAQGRTD	PNQATGTSIQ	FCNIIA	S G D	LERPVMIVGD	GMYATTI TGSI	NVVEGSTTF	RSATL
2 00	N M V I A Q G H I D	PNQATGISIQ	FCDITASPDL	K P V V K E F P I Y		IV V MESSLGGI	IDPSGWAEW	HGDFA
4 S G N V S	GYLTAPSTNI	NOKYGLVITN	SRVI RESDSV	PAKSYG	LGRPWHPITTT	ESDGRYADPN	AL GOTVEL NT	SMDNH
		nun ou rrin				o b an i n b i n i	in a drift E hit	O IN D IV II
	330	340	350	360	370	380	390	400
	+	+	+	+	+	+	+	+ .
TAAVGQ	V G E E M N N G P G	NIAGPARDOA	VALHVKWPGY TSKRVKWPGV	HVITOPAKAM	SETVAKLI QG	GSWLHSIGVA GSWIBSTDVAN	VDGLYD	
3 NTENV	TFVEYGNTGT	GAEGPRANES	SELTEPITIS	WLLGSDWEDW	VDTSYIN			
4 I Y G W D	KMSGKDKNGN	TIWFNPEDSR	FFEYKSYGAG	AAVSKDRRQL	TDAQAAEYTQ	SKVLGDWTPTL	P	<mark>.</mark>

Figure 3.5. : Homologies détectées lors de l'alignement multiple des séquences : - PME 1_LYCES. - PME 2_LYCES. - PME_ASPTU. - PME_ERWCH.

Tableau 3	3.2.	:	Pourcentage	d'identité	obtenu	après	comparaison
		C	le séquences	protéiques	s de PM	IE.	

Types de séquences.	% d'homologie.	nombre d'aa.
 PME 2 LYCES	100	389
PME 1_LYCES	57.7	305
PME-ASPTU	26.7	331
PME-ERWCH	24.9	366

b. Alignements multiples.

Lorsque l'on compare les quatre séquences de PME, en acceptant un champ d'analyse de 50 acides aminés, on remarque que les séquences PME_ASPTU et PME_ERWCH sont très proches (coefficients de corrélation -0.08/0.3 et -0.1/0.24), que PME2_LYCES est proche de PME1_LYCES mais également proche des PME_ASPTU et PME_ERWCH (-0.38/-0.4 et 0.62/-0.15 et-0.08/0.3 et -0.1/0.24), ce qui n'est pas le cas de PME1, ce qui fait que PME1 et PME2 soient quand même distantes (figure 3.3.)

Lorsque l'on compare les quatre séquences de PME, en acceptant un balayage de 500 résidus, on remarque que les séquences PME2_LYCES, PME_ERWCH et PME_ASPTU (-0.05/0.15 et -0.15/0.12 et -0.09/-0.3) sont encore relativement proches tandis que PME1_LYCES (0.33/0.01) est plus lointaine. (figure 3.4.)

L'analyse d'alignement multiple (figure 3.5) nous révèle la présence de portions conservées :

Pour les quatre séquences,

- de l'aa 60 à 73 (référence à la séquence PME2_LYCES)
- de l'aa 190 à 225
- de l'aa 244 à 254
- de l'aa 283 à 292

Pour les trois première séquences,

- de l'aa -59 à 107
- de l'aa 176 à 185
- de l'aa 189 à 226
- de l'aa 244 à 266
- de l'aa 283 à 292

Sequence: Tom.mod les gels ? [1684]

Duplex Formation (position of the oligo = 335): Upper Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, +1.9 kcal/mol 5' CGGGATCCCGGGTAAGGACATTGGAGCGAA 3' || : :::

3' AAGCGAGGTTACAGGAATGGGCCCTAGGGC 5'

Upper Primer: the most stable dimer: 10 bp, -24.3 kcal/mol 5' CGGGATCCCGGGTAAGGACATTGGAGCGAA3'

3' AAGCGAGGTTACAGGAATGGGCCCTAGGGC 5'

Sequence: Tom.mod les gels ? [1684]

Hairpin: $\Delta G = -2.2$ kcal/mol, Loop = 4 nt, Tm = 64° 5' CGGGA ||| T

3' AAGCGAGGTTACAGGAATGGGCCCT

Duplex Formation (position of the oligo = 1279): Lower Primer: no 3'-terminal dimer formation Lower Primer: the most stable dimer: 10 bp, -24.3 kcal/mol 5' CGGGATCCCGTAATCCATCCACATACGCCA3' |||||||||||| 3' ACCGCATACACCTACCTAATGCCCTAGGGC 5' Hairpin: ΔG = -2.2 kcal/mol, Loop = 4 nt, Tm = 64°

Hairpin: $\Delta G = -2.2$ KCai/moi, Loop = 4 ht, im = 64 5' CGGGA ||| T 3' ACCGCATACACCTACTACTACTGCCCT

Figure 3.6. : Formation de dimères avec les amorces 1 / 2. a. Amorce 1-Amorce 1. b. Amorce 2-Amorce 2.

Sequence: Tom.txt les gels ? [1665]

> ||| 3' ACCGCATACACCTACCTAAT 5'

Figure 3.7. : Formation de dimères : Amorce 1-Amorce 2.

Pour les deux premières séquences,

- de l'aa 58 à 111
- de l'aa 119 à 133
- de l'aa 137 à 145
- de l'aa 147 à 155
- de l'aa 173 à 185
- de l'aa 188 à 271
- de l'aa 283 à 292
- de l'aa 344 à 392

On peut remarquer la grande homologie entre PME2_LYCES et PME1_LYCES. Or leurs coefficients de corrélation (-0.38/-0.4 et 0.62/-0.15 pour m=50 et -0.05/0.15 et 0.33/0.01 pour m=500) nous informaient d'une moindre homologie. Ceci s'explique sans doute par la présence de nombreux petits segments homologues qui induisent le programme en erreur (par exemple, la présence de nombreuses hélices alpha peut produire ce type d'erreur ...) en créant un énorme bruit de fond (refus de séquences homologues longues.)

La grande région homologue représente sans doute un site de fixation pour le substrat, tandis que le reste des séquences servirait à l'adressage spécifique de l'enzyme par exemple.

c. Choix des amorces 1/2.

Nous avons choisi les premiers oligonucléotides dans la partie codante de la protéine mature (figure 1.17).

	Situation (bases)		Situation (acides aminés)		
Amorce 1	335	354	54	60	
Amorce 2	1270	1289	365	372	

On leur a ajouté côté 5' un site BamH I de 10 bases, ce qui nous donne des amorces de 30 bases. Ceci afin de faciliter un clonage ultérieur ne présentant en principe aucune difficulté de digestion.

Est 1 : 5' CGGGATCCCGGGTAAGGACATTGGAGCGA 3'

Est 2 : 5' CGGGATCCCGTAATCCATCCACATACGCCA 3'

Nous avons vérifié ces oligonucléotides avec le logiciel "oligo 4". Ce dernier teste le couple d'amorces sur lui-même afin de détecter la formation possible de dimères (figure 3.6.). On peut observer la formation d'un dimère stable par appariement des 10 bases du site BamH I, mais ce dernier se situant du côté 5', cela n'interferera pas avec la réaction. En effet, la polymérase qui synthétise de 5' en 3' ne rencontre pas de matrice.

Le logiciel teste également les amorces entre eux (figure 3.7.) On peut observer la formation de 3 dimères par appariement de 3 bases au maximum. Comparé aux 20 bases spécifiques à la région d'origine, ces dimères ne peuvent entrer en compétition suffisante pour interferer avec la réaction.

De plus, si l'on regarde les comparaisons de séquences protéiques et les alignements multiples, on remarque que l'amorce 2 se situe dans une zone de grande homologie entre les deux isoenzymes de tomate tandis que l'amorce 1 est moins bien située car seul trois acides aminés sur les dix se situent dans une région homologue entre PME de tomate (figures 3.1. et 3.5.). Ils pourront peut être s'hybrider à différents gènes, allèles de PME s'ils existent et ainsi amplifier plusieurs gènes.

Les amorces peuvent donc être utilisées pour l'amplification. En effet, elles présentent - 44% de GC,

- peu de dimères stables,
- une situation en partie dans des zones homologues.

Est 1 présente un température d'hybridation de 54°C tandis que Est 2 en présente une de 51.2°C.

Ils devraient nous donner un produit d'amplification cDNA de 955 bp (sans sites BamH I).

d. Choix des amorces 3/4.

Nous les avons également choisis dans la partie codante de la protéine mature. Ils se situe entre les deux premieres amorces.

	Situation (bases)		Situation (aci	des aminés)	
Amorce 3	419	438	82	88	
Amorce 4	1246	1265	357	364	

On leur a ajouté côté 5' un demi site BamH I, ce qui nous donne des amorces de 23 bases. Ce demi site de restriction nous permettera d'effectuer un clonage particulier adapté aux produits obtenus par amplification PCR (matériels et méthodes : 25). a. Amorce 3 / Amorce 3

1. 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3' //////////// 3' CGCAGAATGAGAATAGACCACCT 5'

2. 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3' / / / / / 3' CGCAGAATGAGAATAGACCACCT 5'

3. 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3' ///// 3' CGCAGAATGAGAATAGACCACCT 5'

CGCAG |·||·A 4. 5' TCCACCAGATAAGAGTA

b. Amorce 4 / Amorce 4.

1. 5' TCCAGTAGACCTCAACCATGATC 3' 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'

3. 5' TCCAGTAGACCTCAACCATGATC 3' /// /// 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 3'

4. 5' TCCAGTAGACCTCAACCATGATC 3' ///// -3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'

5. 5' TCCAGTAGACCTCAACCATGATC 3' / //// / 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'

- c. Amorce 3 / Amorce 4.
- 2. 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3' 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'
- 3. 5' TCCACCAGATAAGAGAGTAAGACGC 3' ///// 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'
- 4. 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3' /// / // / 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'
- 5. 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3' // // 3' CTAGTACCAACTCCAGATGACCT 5'

Figure 3.8. : Formation de dimères avec les amorces 3 /4. a. Amorce 3-Amorce 3.

b. Amorce 4-Amorce 4.

c. Amorce 3-Amorce 4.

Est 3 : 5' TCCACCAGATAAGAGTAAGACGC 3'

Est 4 : 5' TCCAGTAGACCTCAACCATGATC 3'

Nous les avons vérifiées avec le logiciel Primer (Lincoln : MIT center for genome research and whitehead institude for biomedical research). Ce logiciel teste les amorces sur elles-même,

entre eux,

sur leur taux en GC,

sur leur température d'hybridation.

Il suffit de donner la position de l'oligo, le nombre de bases le constituant et la température d'hybridation. Le maximum de self complémentarité étant de 10 bases côté 5' et de 8 bases côté 3', il a accepté ce couple d'amorces malgré la présence de dimères (figure 3.8.).

De plus, si l'on obsèrve les comparaisons de séquences protéiques et les alignements multiples, on remarque que les amorces se situent dans des zones d'homologies entre PME de tomate (figures 3.1. et 3.5.). Ils devraient donc amplifier différents gènes ou allèles s'ils existent.

Est 3 présente un température d'hybridation de 51.2°C et 45% de GC tandis que Est 4 en présente 51.3°C et 45%. Ces amorces devraient nous donner un produit d'amplification cDNA de 845 bases (sans sites BamH I).

3. MISE AU POINT DE L'AMPLIFICATION SUR CDNA.

Les amorces synthétisées (Eurogentec) sont resuspendues avec de l'eau. On détermine leur concentration afin d'obtenir des solutions d'1mg/ml.

- 10 M - 1	Echantillons	Densité 260nm	optique 280nm	Concentration (mg/ml)	rapport (260/280)
	Blanc	0	0.004		
	Primer 1A	0.972	0.576		1.7
	В	0.973	0.568	9.72	1.72
	Primer 2A	1.112	0.602		1.86
	В	1.046	0.589	10.72	1.89
	Blanc	0	0.001		
	Primer 3A	1.180	0.588		2
	В	1.349	0.675	12.645	2
	Primer 4A	1.214	0.662		1.84
	В	1.218	0.667	12.16	1.83

Tableau 3.3. : Prise de densité optique des primers reçus.

La concentration C = DO 260nm x dilution x 0.02 car 1 DO = 0.02 mg/ml.

L'amplification est réalisée sur un clone pPE1 (contenant le cDNA de PME isolé par Ray.) comme source d'ADN.

Pour les amorces 1/2, on a testé :

-	deux	dilutions d'ADN :	- 185 pg/ul
			- 1.85 ng/ul
-	deux	Taq polymérases :	- Boehringer
			- Promega bleue (sans gélatine)
-	trois	concentrations en	MgCl ₂ : 1.5/2/2.5mM.

L'amplification est effectuée selon les conditions suivantes :

1.	92°C	6 minutes		
	Ajout of	de l'enzyme.		
2.	92°C	1 minute		
	53°C	2 minutes	20 cycles.	
	72°C	2 minutes		
3.	72°C	10 minutes		

Pour les amorces 3/4, on a testé :

-	deux	dilutions d'ADN :	-	185 pg/ul
			-	1.85 pg/ul
-	deux	taq polymérases	: -	Boehringer
			-	Promega bleue (sans gélatine)
-	quatr	e concentrations	en	MgCl ₂ : 1/1.5/2/2.5mM.

L'amplification est effectuée selon les conditions suivantes :

1.	92°C	6 minutes	
	Ajout	de l'enzyme.	
2.	92°C	1 minute	
	51°C	2 minutes	20 cycles.
	72°C	2 minutes	
3.	72°C	10 minutes	

Chacune de ces deux expériences comprend un contrôle négatif représenté par l'absence d'ADN dans la réaction et un contrôle positif représenté par une amplification mise au point auparavant (ici, la taille attendue du produit devrait être 700 bases). Figure 3.9. : Droite d'étalonnage de la photo 3.





Photo 3. : Produits d'amplification obtenus sur cDNA. (tableau 3.4.)

On analyse les résultats sur gel d'agarose 1.5% en tampon TAE. On y dépose 10 ul d'amplification par puit (photo 3, figure 3.9.). Les marqueurs utilisés sont le Φ X174 Hae III (2 µI par puit) et le λ HInd III EcoR I (4 µI par puit).

Pour les amorces 1/2, on remarque déjà une amplification avec 1.85 ng d'ADN aussi bien avec l'enzyme Boehringer qu'avec Promega 2.5mM. Pour 18 ng, on n'observe plus qu'une amplification avec Boehringer.

Il est possible qu'il faille des quantités d'ADN plus faible pour que l'enzyme Promega travaille correctement.

Ou alors, l'enzyme dans certains échantillons a été dégradée. En effet, l'amplification PCR est une expérience très sensible aux variations de température.

Il se peut également que le rapport enzyme/ADN soit meilleur pour l'enzyme Boehringer (dans ce cas) que pour l'enzyme Promega.

Pour les amorces 3/4, on remarque déjà une amplification avec 1.85 ng d'ADN. Seule l'enzyme Promega a donné des résultats positifs dans un ordre de 2 à2.5mM de MgCl₂. Le rapport ADN/enzyme etait sans doute adéquat pour Promega et non pour les autres enzymes.

- 18 M		Strick.		Tailles cD	NA (bases)
Puits	Quantité d'ADN (ng)	MgCl2 (mM)	Таq	attendues	observées
Amorce	s 1/2		1		
1	1.85	2.5	Promega	975	920
2	1.85		Boehringer	975	920
3	1.85		Boehringer	975	920
4	0	la trans an	Boehringer	0	0
Amorce	s 3/4				
10	1.85	2	Promega	851	820
11	1.85	2.5	Promega	851	820
12	0		Promega	0	0
13	contrôle posit	if*		700	700

Tableau 3.4. : Produits d'amplification obtenus sur cDNA.

44







4. MISE AU POINT DE L'AMPLIFICATION SUR ADN GENOMIQUE.

a. Utilisation des amorces 1/2.

Nous avons réalisé une première expérience à partir d'ADN génomique provenant du fruit de la tomate (échantillons 1 et 2). Nous avons testé quatre enzymes et deux concentrations en MgCl2. Les température appliquées sont les suivantes :

- 1. 93°C 8 minutes
 - Ajout de l'enzyme.
- 2. 93°C 1 minute 53°C
 - 2 minutes
 - 72°C 2 minutes
- 3. 72°C 10 minutes

Nous avons ensuite analysé les résultats sur gel d'agarose 0.8% et 1.5% en déposant15 µl d'amplification. (photos 4 et 5, figure 3.10.) Les margueurs utilisés sont le λ Hind III et λ Hind III EcoR I.

35 cycles.

Tableau	3.5.	: Produits	d'amplification	obtenus	sur	ADN	génomique
		avec les	amorces 1/2.				

Puits	ADN et quantité Enzyme MgCl2		MgCl ₂	Tailles (ba	ises)
	(ng)		(mM)	Observées	Attendues sur cDNA
1	1: 590	Boehringer		1	975
2	: 59			1	
3	2: 490		1	1	
4	: 49		·	1	
5	1: 590	Promega	2	1500	
		rouge*	1	1250	"
	👌 🛛 🗖 🔤 🖓			1000	"
				740	
				560	
6	1: 59		2	1250	
			-	560	
7	1: 590		4	1500	
	1. 000		1	1250	
	1 St. 5			1000	
				740	
				560	
8	1. 50		4	1500	
0	1. 59			1250	
				1000	n
				740	
		1 - 11 - 11 - 11 - 11 - 11 - 11 - 11 -		740	
. Beller				560	

4.5



Photo 4. : Produits d'amplification 1 obtenus sur ADN génomique avec les primers 1/2 (tableau 3.5.).



Photo 5. : Produits d'amplification 1 obtenus sur ADN génomique avec les primers 1/2 (tableau 3.5.).

Puits	ADN et quantité	Enzyme	MgCl2	Tailles (bases)		
	(ng)			Observées	Attendues	
				1 August	sur cDNA	
9	2: 490	Promega	2	1500	975	
		rouge	12.	1250	11	
				1000	"	
	Service Service	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		740		
			1 S	560		
10	2: 49		2	1250		
11	2: 490		4	1250	"	
12	2: 49	1. P	4	1250	н	
13	1: 590	Promega	2	1400		
		bleue*		1250		
14	1: 59		2	1250	"	
15	1: 590		4	1400		
		and a second		1250	н	
		The first of		1000		
			Section 1994	670	"	
				560		
16	1: 59		4	1250	"	
17	2: 490	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	2	1400		
		1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1		1250	"	
			1	1000		
	and the second			670	n	
				560		
18	2.49	"	2	1250		
10	2. 40		2	1000		
10	2. 100		1	1000		
20	2: 490		4	1250	**	
21	1: 500	Cotus	4	1250	075	
21	1. 550	Oelus		1200	975	
				1000	"	
				670		
				560	"	
22	1: 50			1200		
22	1. 59			1200		
				500	"	
0.0	0, 400	"		500		
23	2: 490			1350		
				1200		
				1000		
				6/0		
	0.10			560		
24	2: 49	"		1200		
8 2 4	and the first of			1000		
	A section of			560		
25	Contrôle néga	tif	alter of the	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	30	



Photo 6. : Produits d'amplification 2 obtenus sur ADN génomique avec les primers 1/2 (tableau 3.6.).



Photo 7. : Produits d'amplification 3 obtenus sur ADN génomique avec les primers 1/2 (tableau 3.7.).

*Promega rouge (avec gélatine)/Promega bleue (sans gélatine).

Cette expérience est reproductible, en voici les résultats après analyse sur gel 0.8%. (photos 6 et 7, figures 3.11. et 3.12.).

Tableau 3.6. : Produits d'amplification obtenus sur ADN génomique avec les amorces 1/2.

Puits	ADN et quantité	Enzyme	Résultats : Tailles (bases)		
	(ng)		Observées	Attendues sur cDNA	
1	7 : 5900	Promega B	1200	975	
2	7 : 590	"	1	"	
3	7 : 59		1	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
4	Contrôle négatit	F	1	30	
5	7 : 5900	Cetus	1150	975	
6	7 : 590	"	1		
7	7 : 59	"	1		
8	Contrôle négati	F	1	30	

Tableau 3.7. : Produits d'amplification obtenus sur ADN génomique avec les primers 1/2.

Puits	ADN et quantités	Enzyme	MgCl2 (mM)	Résultats : tailles (bases)		
	(ng)			Observées	Attendues sur cDNA	
1	10 : 4900	Promega B	2	1300	975	
2	10 : 490	"	2	1300		
3	10 : 49		2	1	n	
4	Contrôle négatif	1.1		1	30	
5	10 : 4900		4	1300	975	
6	10 : 490		4	1		
7	10 : 49		4	1	"	
8	Contrôle négatif			1	30	

On remarque :

- un profil caractéristique de plusieurs bandes dans la première expérience dont une d'environ 1250 bases plus intense que l'on retrouve seule lorsque l'on refait d'autre expériences PCR
- la disparition des bandes annexes lorsque la quantité d'ADN chute d'un facteur 10 et que la concentration en MgCl₂ augmente.
- que la taille dépasse largement la taille attendue pour le cDNA (975 b).

Figure 3.11. : Droite d'étalonnage de la photo 6.



Frar Les Papiers Canson 1

Figure 3.12. : Droite d'étalonnage de la photo 7.



min.

La présence de plusieurs bandes d'amplification peut s'expliquer de diverses manières :

- Les amorces se sont hybridées à une autre région du gène de PME 2, ce qui semble peu probable vu que les logidciels Oligo 4 et Primer refusent les amorces de ce type.
- Les primers se sont hybridés à une autre région du génome végétal.
 Le fait que les bandes annexes disparaissent lorsque la quantité d'ADN chute d'un facteur 10 et que la concentration en MgCl₂ augmente apporte un argument en faveur de cette hypothèse.
- Les primers se sont hybridés à d'autres gènes, allèles de PME.

Ces hypothèses seront vérifiées plus tard par une hybridation de type southern utilisant comme sonde un fragment Pst I du cDNA (pPE1 isolé par Ray) de PME2_LYCES.

La taille obtenue pour la bande la plus intense (1300 b.) dépasse largement la taille attendue pour le cDNA (975 b.).

Cette différence de 325 b. peut s'explique :

- par la présence d'un ou plusieurs inserts, Woodrow l'a d'ailleurs constaté chez la tomate Alisa Craig en séquençant partiellement les deux clones génomiques qu'il a mis en évidence.
 Ils contiendraient au moins deux introns de 207 et 89b. dont la position (à la base 600 et 780 du cDNA isolé par Ray en 1988) et la séquence seraient conservées parmi les différents gènes,
- par la présence de divers allèles de PME,
- par la présence de divers gènes de PME, comme ce fut constaté par Woodrow en 1990. Il existerait trois gènes différant surtout par leur séquence 3' terminale non transcrite, mais leur taille totale est quasiment identique pour tous (à 600b. près),
- par une différence variétale : le cDNA est isolé d'une tomate Alisa Craig et les amplifications ont été réalisés sur des tomates de variétés inconnues (commerce). Cette éventualité pourrait être négligée car lors des études de polygalaturonases chez la tomate, diverses variétés ont également été utilisées et aucune différence notables n'a été décelée (Ray, 1988, Fischer, 1991).





Photo 8. : Produits d'ampification obtenus sur ADN génomique avec les primers 3/4 (tableau 3.8.).

b. Utilisation des primers 3/4.

Nous avons réalisé une première expérience en utilisant la taq polymérase Promega bleue (2 mM MgCl₂), vu qu'elle nous a donné de bons résultats avec les deux premiers primers.

Les températures appliquées sont les suivantes :

1.	93°C	8 minutes		
	Ajout	de l'enzyme.		
2.	93°C	1 minute		
	51°C	2 minutes	35	cycles.
	72°C	2 minutes		5 6
3.	72°C	10 minutes		

Nous avons ensuite analysé les résultats sur gel d'agarose 1.5% en y déposant 20 μ l de produit d'amplification (photo 8., figure 3.13). Les marqueurs utilisés sont le λ Hind III et Φ X174 Hae III.

Puits	ADN et quantités	Résultats : tailles (bases)			
	(ng)	Observées Attendues sur cDNA			
1	Charlotte : 1000	1000* 851 310 "			
2	Rosabelle : 1000	1000* 851 310 "			
3	Recento : 1000	/ "			
4	Capello : 1000	/ "			
5	Punch : 1000	/ "			
6	Trend : 1000	/ "			
7	7 : 6000	/ "			
8	7 : 600	/ "			
9	7 : 60	/ "			
10	Contrôle négatif.	1 1			

Tableau 3.8. : Poduits d'amplification obtenus sur ADN génomique avec les primers 3/4.

Nous avons de nouveau effectué cette même expérience, en utilisant de l'ADN provenant d'une nouvelle extraction afin d'utiliser du matériel frais. Nous avons alors pu observer une amplification chez la tomate Punch en utilisant 1 µg d'ADN.

Ce produit d'amplification fait 1150 b. (photo 9)

49

N.B. Les tailles marquées * correspondent à des valeurs calculées à partir de la phote 10 car nous pouvons y comparer la taille des produits obtenus chez la tomate (Punch) et la pomme de terre (Rosabelle et Charlotte).

On remarque :

- une seule bande d'amplification aussi bien chez la tomate que chez la pomme de terre.

On peut l'expliquer par diverses hypothèses :

- Il n'existe qu'un seul gène de PME, or on n'observe plusieurs isoenzymes et un seul type d' ARNm (1.6 kb.), il ne peut donc pas y avoir un processing différent (Ray, 1988, Marcovik, 1986). De plus, Woodrow a clairement constaté l'existence de trois gènes de PME chez la tomate Alisa Craig. Cette hypothèse semble donc peu probable.
- Il existerait plusieurs gènes mais les conditions des expériences ne permettent d'en amplifier qu'un seul :
 - Les amorces se situent dans des zones homologues (protéiques,) mais la séquence nucléique peut être trop différente.
 - L'ADN génomique utilisé peut être partiellement dégradé au niveau des gènes de PME.
- Il existerait plusieurs gènes mais ils auraient tous plus ou moins la même taille et ne sauraient donc pas être détectés par analyse sur gel d'agarose.
- Il existerait plusieurs gènes mais la partie amplifiée pourrait être de même taille pour tous. Il s'agirait d'une portion très conservée, ce qui semble plus probable vu que Woodrow constate que les deux clones qu'il a isolés sont presqu'identique (Gen2 possède 600bp différentes côté 5' et Gen3 possède 600bp en plus côté 3')

5.0





Figure 3.14. : Plasmide pBR322 Plasmide pAT153

- que la taille du produit d'amplification (1000 et 1100 b.) dépasse largement la taille attendue du cDNA (851 b.).
 Cette différence de 227 bases s'expliquerait :
 - par la présence d'un ou plusieurs inserts, ceci semble très probable car les deux introns détectés par Woodrow en 1990 se situent après la base 600 du cDNA isolé par Ray en 1988 et après la base 780.
 Il se retrouve donc dans nos produits d'amplification. Leurs tailles respectives sont de 207b. et 89b. ce qui nous donnerait un produit d'amplification sur ADN génomique d'une taille supérieure de 296b. à la taille attendue sur cDNA. Cette valeur correspond à celle observée (227b.).
 - par la présence d'allèles différents dont l'amplification auraient été favorisée par les conditions de ces expériences.
- c. Vérification des amplifications par une hybridation de type southern.

Nous avons réalisé un southern afin de vérifier les différentes hypothèses élaborées dans le paragraphe précédent :

- Le profil d'amplification obtenu avec les amorces 1/2 présentant plusieurs bandes,
- Le profil d'amplification obtenu avec les amorces 3/4.

Pour cela, nous avons transféré les différents échantillons d'amplification PCR génomique et cDNA sur une membrane (photo 9) et nous avons utilisé comme sonde, un fragment du cDNA contenu dans pPE1.

Il s'agit d'un clone cDNA isolé de tomate Alisa Craig (isoenzyme isolé par Ray en 1988). Cet insert est cloné en un site Pst I du plasmide pAT153 (Slater, 1985). Il s'agit d'un plasmide de type pBR322 ayant subit une délétion de 620 bases au site Hae II. Les cellules contenant ce plasmide présentent 1.5 à 3 fois plus de plasmides que la normale et il a aussi l'avantage d'avoir perdu le gène nic codant l'origine de transfert de confugaison. Il se réplique dans les cellules traitées au chloramphénicol. (figure 3.14.) (Twigg, Sheratt, 1980).

La sonde est obtenue après digestion Pst1 de l'ADN plasmidique contenu dans pPE1. (photo 10., figure 3.15.)



Figure 3.15. : Droite d'étalonnage de la photo 10.



Photo 10. : Analyse de digestion Pst1 du clone pPE1. (Tableau 3.9.). Puits : 3. pPE1 digéré Pst1 (2 µg dans 10 µl)

6. λ Hind III (2 µl dans 10 µl réaction)

7. Φ X174 Hae III (1 µl dans 10 µl réaction)






Photo 9. : Produits d'amplifications sur ADN génomique avec les primers 1/2 (amplifications 1,2,3) et avec les primers 3/4. (tabmeau 3.10.)

On peut observer 4 fragments après digestion Pst1.

Tailles observées (bases)	Tailles attendues (bases)
3800	3740
1025	1060
420	416
250	189

Tableau 3.9. : Analyse de digestion Pst1 du clone pPE1.

Nous avons marqué le fragment de 1060 b. par nick translation (matériels et méthodes : 29-32) après purification de celui-ci par gene clean et nous l'avons alors utilisé comme sonde lors d'une hybridation 3XSSC à 65°C (photo 11, figure 3.16.).

Tableau 3	.10. :	Er	nsemble	des	р	rodu	its	d'a	mplification	transférés
	:	sur	membra	ne e	en	vue	d'u	ne	hybridation	southern.

and the second se	A REAL PROPERTY AND A REAL			1	
Puits	amorces	Echantillons	PCR	MgCl2	Enzyme
1	1/2	6	1	2 mM	Promega
2	1/2	1	2	2 mM	"
3	1/2	1	3	2 mM	
4	1/2	2	3	2 mM	
5	1/2	Contrôle néa	atif	2 mM	
6	1/2	15	1	4 mM	
7	1/2	5	3	4 mM	и 🚬
8	1/2	Contrôle néa	atif	4 mM	
9	1/2	5	1 2		Cetus
10	1/2	Contrôle nég	atif		"
11	1/2	Contrôle posi	tif (pPl	E1)	Promega
12	Contrôle Contrôle	négatif du south négatif du south	 ern:Φ ern:λ	X174 Hae I Hind III Eco	II R I
			1	1	
14	3/4	2	1	2 mM	Promega
15	3/4	1	1	2 mM	"
16	3/4	12	2	2 mM	"
17	3/4	Contrôle néa	atif	2 mM	
18	3/4	Contrôle posit	tif (pP	E1)	
				. 6	



Photo 11. : Vérification des produits d'amplification par une hybridation southern (tableaux 3.10. et 3.11.)

Puits	Tailles (bases) sur gel	Tailles (bases) sur autoradigraphie	Tailles (bases) attendues sur cDNA
1	1250 500	1250	975
2	1200	1200	н
3	1300	1300	
4	1300	1300	"
5	1	1	30
6	1250	1250	975
	1000		
	670		
	540	a 1	
7	1300	1300	"
8		1	30
9	1150	1150	975
10	1	1	30
11	990	990	975
14	1000	1000	851
	300	2 ⁻	
15	1000	1000	
	300		11
16	1100	1100	п
17			23
18	840	840	851

Tableau 3.11.: Produits d'amplification analysés sur gel et vérifiés par hybridation southern.

L'autoradiographie nous permet de conclure :

- que le produit d'amplification le plus intense obtenu avec les primers 1/2 correspond bien à un gène de PME.

que les autres produits d'amplification (moins intenses) obtenus avec les primers 1/2 ne correspondent pas à des gènes de PME. Les bandes annexes sont sûrement obtenues par hybridation des primers en d'autres endroits du génome. Ce bruit de fond peut d'ailleurs être éliminé en diminuant la quantité d'ADN, en augmentant la concentration en MgCl2 ainsi qu'en appliquant une température d'hybridation spécifique au primer durant l'amplification.

Mais elle ne nous permet pas de démontrer la cause de l'amplification d'un seul produit de pectine méthyl éstérase.



Photo 12. : Vérification de la linéarisation du pUC18
Puits : 2. pUC18 (0.6 μg dans 10 μl réaction)
3. λ Hind III (1 μl dans 10 μl réaction)
4. λ Hind III (3 μl dans 10 μl réaction)

B. TENTATIVE DE CLONAGE D'UNE SONDE GENOMIQUE.

Nous avons décidé de cloner un produit d'amplification génomique selon un procédé spécifique aux produits obtenus par PCR (matériels et méthodes :25) Ceci, afin de disposer d'une quantité importante de matériel pur (c'est-àdire seulement le bon produit d'amplification, sans produits annexes ni contaminants quelconques) durant une période indéterminée.

Cette technique particulière est utilisée afin de faciliter le clonage car lors de la synthèse des amorces 1/2, nous avions perdu un des sites de restriction d'une amorce et le clonage était devenu impossible. De plus, la présence de sites de restriction identiques et entiers aux extrémités des deux amorces permet la formation de dimères stables pouvant interférer avec la réaction PCR.

Nous obtenons ainsi des outils que l'on pourra facilement caractériser (carte de restriction, séquençage...) et utiliser lors d'hybridations southern et criblages de banques.

1. PREPARATION DU PLASMIDE.

Nous avons utilisé un pUC 18 que nous avons linéarisé par digestion BamH I et déphosphorylé (matériels et méthodes : 20-22).

La photo 12 nous montre la vérification de la linéarisation. On observe bien une seule bande à 2690 bases ce qui correspond à la taille du plasmide.

La déphosphorylation est vérifiée par une religation du plasmide suivie d'une transformation dont voici les résultats :

Quantité plasmide	Colonies	10100	Colonies	/pg
(pg)	Bleues	Blanches	Bleues	Blanches
250	1	0	0.004	0
250	0	0	0	0
750	0	0	0	0
750	0	0	0	0
Négatif	0	0	0	0
500	1	0	0.002	0
500	1	0	0.002	0
1500	6	0	0.004	0
1500	6	0	0.004	0
Positif :10	1008	6	100.8	0,6
10	1300	5	130	0,5
10	1544	2	154.4	0,2

Tableau 3.12. : Colonies observées après transformation.

On n'observe pas de colonies (ou très peu), ce qui signifie que le plasmide linéaire est bien déphosphorylé (c'est-à-dire qu'il ne peut se recirculariser). En effet, sous forme linéaire, le plasmide pénètre dans la bactérie mais il n'a plus la possibilité de s'exprimer. De ce fait, il ne peut apporter la résistance à l'ampicilline dont la bactérie a besoin pour croître sur le milieu LB Xgal Amp où elle se situe. Le taux de transformation du pUC 18 standard varie entre 101 et154 colonies/pg.

2. INSERTION DE L'ADN AMPLIFIE.

Nous avons décidé d'utiliser un protocole de clonage spécifique aux produits PCR (matériels et méthodes : 25), dont voici les résultats après transformation (matériels et méthodes : 25-27) :

Pour 25 ng de plasm	ide (5 ng par d	étalement A,B,	C,D,E).	Dennerte
(na nour 0.2 ml)	Ligation	Blouos	Blanches	(blanc/blou)
	(μι)	Dieues	Dialicites	(blalic/bleu)
5	3 / A	4	174	43.5
5	3 / B	5	210	42
5	3/C	5	230	46
5	3 / D	10	187	18.7
5	3/E	8	189	23.625
8.5	5/A	11	77	7
8.5	5 / B	14	82	5.86
8.5	5/C	12	90	7.5
8.5	5/D	3	77	25.6
8.5	5/E	6	85	14.2
13.5	8/A	2	. 4	2
13.5	8 / B	0	6	1
13.5	8/C	4	4	1
13.5	8/D	2	_7	3.5
13.5	8 / E	0	5	1
0	0/A	2	0	0
0	0 / B	3	0	0
0	0/C	5	0	0
0	0 / D	2	0	0
0	0/E	5	0	0
Négatif: 0		0	0	0
Positif : 0,01		1204	5	0.004
0,01	al per stars in a	1200	4	0.003
0,01		1008	3	0.003

Tableau 3.13 : Colonies observées après transformation.

5.5





Figure 3.17.a. : Droite d'étalonnage de la photo 13 (dessus). b. : Droite d'étalonnage de la photo 13 (dessous).

Pour 50 ng de plasm	ide (10 ng par	étalement A,E	3,C,D,E).	1.1
Quantité d'insert	Ligation	Colonies		Rapports
(ng pour 0,2 ml)		Bleues	Blanches	(Blanc/Bleu)
			11111	
10	3 / A	8	305	38.125
10	3 / B	13	321	24.7
10	3 / C	7	320	45.7
10	3 / D	16	324	20.25
10	3 / E	9	259	28.8
17	5/A	2	98	49
17	5 / B	4	111	27.75
17	5/C	2	-98	49
17	5 / D	9	106	11.8
17	5/E	2	88	44
27	8 / A	4	3	0.75
27	8 / B	7	6	0.86
27	8/C	7	11	1.6
27	8 / D	3	11	3.7
27	8 / E	3	8	2.7
0	0/A	12	3	0.25
0	0 / B	19	1	0.05
0	0/0	15	0	0
0	0 / D	24	3	0.125
0	0/E	15	0	0
Négatif: 0	• • -	0	0	0
Positif : 0.01		1204	5	0.004
0.01		1200	4	0.003
0.01		1008	3	0.003
0,01		1000		0.000

Tableau 3.13. : Colonies observées après transformation.

On remarque que le taux de colonies blanches obtenues est très élevé (surtout pour 3 et 5 µl d'ADN utilisés lors de la ligation).

On analyse quelques unes de ces colonies blanches en extrayant l'ADN plasmidique qu'elles contiennent et en digérant ce dernier avec l'enzyme BamH I. Le tableau 3.14. nous donne les résultats obtenus après migration sur gel d'agarose 1% (photo 13, figure 3.17.).



- 21
- Photo 13. : Analyse de digestion BamH I d'ADN plasmidique de colonies positives (tableau 3.14.)

Puits : 1. Contrôle de digestion : pUC18 digéré BamH I 2 à 18. Clones dont on a extrait l'ADN et que

- l'on a digérés avec l'enzyme BamH I.
- 19. λ Hind III
- 20. ΦX174 Hae III
- 21 à 38 Clones digérés BamH I
- 39 λ Hind III et Φ X174 Hae III
- 40 Contrôle de digestion : pUC18 digéré BamH I

Tableau 3.14. : Analyse de digestion BamH I d'ADN plasmidique des colonies positives.

Puits	Taille	s (bases)
	observées	attendues
		en PCR
2/3/6/8 à 15/17	2700	2690
	1800	1000
18	2700	2690
	and a strength	1000
21	2800	2690
		1000
23 à 31/33	2800	2690
	1600	1000
32/34/35/36/37/38		2690
	1600	1000

Les tailles obtenues sont plus élevées que celles attendues sur cDNA (calcul effectué à partir des amorces et de la séquence cDNA de PME2_LYCES (Ray, 1988)).

Cela peut s'expliquer par :

- une mauvaise migration. Normalement, elle est visible avec le bleu, mais la migration s'effectuant la nuit, cela ne peut être contrôlé,
- une concentration inadéquate du gel. Cela semble peut probable car un gel d'agarose d'1% sépare des molécules comprises entre 450 et 6500 bases de taille et les molécules d'ADN à séparer font 1000 et 2690 bases de taille
- une différence trop importante de la concentration en sels entre les échantillons et les marqueurs.
- une digestion partielle des produits d'amplification avant la ligation dans le pUC 18. Si la digestion n'est pas complète, plusieurs produits d'amplification peuvent s'insérer ensemble dans un même plasmide et ainsi donner un insert de taille beaucoup plus grande. De plus, il se peut qu'il existe des sites BamH I dans le produit d'amplification (qu'il s'agisse d'un allèle différent de ceux déjà isolé ou d'un même allèle présentant un ou plusieurs introns) et donc, la taille attendue après digestion serait faussée.

- la présence de contaminants insérés dans le plasmide.





Photo 14. : Vérification du clonage par hybridation southern Puits 1. Amplification PCR obtenu avec l'ADN Rosabelle. 2. Amplification PCR obtenu avec l'ADN Charlotte.

3. pUC18 digéré BamH I (1 µg digéré)

- 4. Clone 9 digéré BamH I
- 5. Clone 9 digéré Pvu II
- 6. Clone 10 digéré BamH I
- 7. Clone 10 digéré Pvu II
- 8. Clone 11 digéré BamH I
- 9. Clone 11 digéré Pvu II
- 10. pUC18 digéré Pvu II
- 11. ФX174 Hae III
- 12. λ Hind III EcoR I
- 13. pPE1 digéré Pst1.



Figure 3.18. : droite d'étalonnage de la photo 14.

3. VERIFICATION PAR SOUTHERN.

Afin de vérifier le clonage, nous avons transféré sur membrane les produits d'amplification PCR obtenus sur l'ADN génomique de pomme de terre avec les amorces 3/4 (parmis ces produits, on trouve celui qui a servi d'insert au clonage), trois clones dont 1 μ g est digéré par deux enzymes (BamH I et Pvu II), deux contrôles de digestion (1 μ g de pUC18 digéré BamH I et Pvu II), un contrôle positif de southern (pPE1 digéré Pst 1) et deux contrôles négatifs de southern (λ Hind III EcoR I et Φ X174 Hae III).

Nous avons utilisé comme sonde le produit PCR obtenu avec l'ADN de pomme de terre Rosabelle (parce qu'il a servi de source d'inserts au clonage), nous l'avons marqué par nick translation après un traitement gene clean pour purifier l'ADN. L'hybridation a été réalisée à 65°C en 3X SSC. Les lavages effectués sont explicités dans matériels et méthodes : 29-32.

L'autoradiographie (photo 14, figure 3.18.) nous révèle qu'il s'agit bien d'un clonage de contaminants. En effet, la sonde s'hybride aux amplifications PCR et au contrôle positif mais pas aux contrôles négatifs, ce qui signifie que le marquage est effectué par la sonde radioactive et non par un excès de dCTP radioactif. De plus, cette sonde n'hybride avec aucun des trois clones ni avec le pUC18, ce qui signifie que l'insert cloné n'est pas le fragment d'origine ayant servi d'insert pour le clonage.

C. TENTATIVE DE CRI.BLAGE DE BANQUES D'ARABIDOPSIS THALIANA.

Deux banques sont utilisées (matériels et méthodes : 33-36) :

- une cDNA : insert cloné dans I ZAP.
- une génomique : insert cloné dans I Charon 35.

Il s'agit d'une brassicacée (2n=10) offrant de nombreux avantages. Elle est de petite taille (8 à 50 cm) et possède un intervalle de génération de 4 à 5 semaines en conditions optimales (sol humide, lumière fluorescente). Son mode de fertilisation est autogame, ce qui assure l'obtention naturelle d'homozygotes tandis que par opérations manuelles simples, on obtient une fertilisation croisée. De plus, de nombreux mutants sont facilement produits par traitement des graines (jusqu'à 10,000 par plant), il existe entre autre des mutants dont le développement (des embryons, des racines, floral, du gamétophyte) est affecté (Koncz, 1992). Arabidopsis thaliana possède un génome de taille minime :

- L'analyse microspectrophotométrique de noyaux colorés l'estime à 2 10⁸ bases.
- L'étude de réassociation d'ADN totaux l'estime à 7 107 bases.
- La relation grandeur de la cellule et volume nucléaire l'estime à 10⁹ bases.(Meyerowitz, 1985).

Ces mesures de taille du génome haploïde démontrent qu'il est le plus petit des angiospermes. Il correspond à la moitié du génome de drosophile et à 5 fois celui de la levure. La taille minime et la simplicité de l'organisation génomique en font un modèle pour l'étude moléculaire des plantes supérieures. Un nombre réduit de clones correspondant à plusieurs fois le génome peut être criblé en peu de temps.

Cette plante constitue donc un outil de travail très précieux : beaucoup de gènes clonés à partir d'Arabidopsis ont pu être étudiés. En effet, des protéines codées par plusieurs gènes dans la plupart des angiospermes semblent correspondre à une petite famille voire un seul gène chez Arabidopsis. Les séquences uniques sont regroupées en grands blocs sur les chromosomes de cette espèce. Par exemple, Chang et al en 1985 ont isolé et séquencé le gène d'Arabidopsis codant l'ADH en utilisant comme sonde, un gène de maïs correspondant (Koncz, Chua, Schell, 1992).

1. TITRAGE DES BANQUES.

Avant de cribler une banque, il est nécessaire de la titrer afin d'établir le nombre de clones à étaler pour représenter la totalité du génome et donc travailler en conditions optimales de réussite (matériels/méthodes : 33-36)

a. Banque cDNA.

10-1	complètement lysé
10-2	
10-3	724
10-4	166
10-5	46
10-6	18
10-7	4

59

a.1. Dilutions des phages dans un tampon SM.

a.2. Dilutions des phages dans un tampon SM+0.1% gélatine.

Dilutions	Nombre de plages de lyse
10-1	complètement lysé
10-2	1900
10-3	221
10-4	72
10-5	16
10-6	0
Titre moye	en : 3770 10 ² plages de lyse/µl.

b. Banque génomique.

b.1. Dilutions des phages en tampon SM.

Dilutions	Nombre de plages de lyse
10-1	1176
10-2	167
10-3	18
10-4	15
10-5	8
10-6	5
10-7	0

10-1	complètement lysé
10-2	369
10-3	60
10-4	19
10-5	0
10-6	4
10-7	. 3

b.2. Dilutions des phages en tampon SM + 0,1% gélatine.



Figure 3.19. : Autoradiographie obtenue par criblage de la banque cDNA d'Arabidopsis thaliana. Révélation de la membrane 1.



Figure 3.20. : Autoradiographie obtenue par criblage de la banque cDNA d'Arabidopsis thaliana; Révélation de la membrane 2.

2. LE CRIBLAGE DES BANQUES.

a. Banque cDNA.

La dilution des phages s'effectuant dans le tampon SM + 0,1% gélatine, nous avons utilisé le titre obtenu avec ce tampon : 377,000 plages de lyse/µl. Le génome d'*Arabidopsis* étant de 7 10⁷ b. et la taille maximale des inserts utilisés pour construire la banque étant de 10,000 b. (Stratagème), 7000 plages de lyse représentent au minimum une fois le génome (matériels et méthodes : 33-36).

Nous avons étalé 9 µl d'une dilution 100 correspondant à 5 fois le génome d'Arabidopsis thaliana au maximum.

Nous avons réalisé deux transferts sur membrane de nylon afin de distinguer les signaux spécifiques d'hybridation et les parasites.

Les filtres traités ont été préhybridés à 37°C, 5X SSC, 40% formamide durant 3 heures afin d'éviter que la sonde ne se fixe à des régions aspécifiques. L'hybridation s'est réalisée dans les mêmes conditions en ajoutant la sonde (fragment pPE1 digéré Pst1) marquée par "nick translation".

On peut détecter la présence de signaux sur l'autoradiographie (figures 3.19. et 3.20.). Mais en comparant les deux membranes, les signaux se révèlent être des signaux parasites.

b. Banque génomique.

La dilution des phages s'effectuant dans la tampon SM, nous avons utilisé le titre suivant : 15,500 plages de lyse/µl.

La taille maximale des inserts utilisés pour construire cette banque génomique étant de 12,000 bases, 5900 plages de lyses sont suffisantes pour représenter une fois le génome (Stratagème).

Nous avons étalé 1 μ l de la banque, ce qui correspond à 3 fois le génome d'Arabidopsis thaliana.

Nous avons également réalisé deux répliques membranaires afin de distinguer les signaux spécifiques des parasites.

La préhybridation a eu lieu en 5X SSC, 37°C, 40% formamide pendant 3 heures suivie d'une hybridation dans les mêmes conditions en ajoutant la sonde (fragment de pPE1 après digestion Pst1) marquée par nick translation.

- 61



Figure 3.21. : Autoradiographie obtenue par criblage de la banque génomique d'Arabidopsis thaliana. Révélation de la membrane 1.



Figure 3.22. : Autoradiographie obtenue par criblage de la banque génomique d'Arabidopsis thaliana. Révélation de la membrane 2. On peut détecter la présence de signaux sur l'autoradiographie (figures 3.21 et 3.22.). Mais après comparaison des membranes, ceux-ci se révèlent être des signaux parasites.

Dans les deux expériences, aucun résultat positif n'est obtenu, seule une introduction à cette technique a pu être réalisée.

Il est possible que l'interprétation difficile des autoradiographies surtout en conditions peu stringeantes en soit responsable.

La représentabilité de la banque peut également être en cause bien que nous ayons étalé jusqu'à 5 fois le génome d'Arabidopsis.

Il est aussi probable que s'il existe un gène de PME chez Arabidopsis thaliana, il ne soit pas homologue à celui de l'isoenzyme 2 retrouvé chez la tomate. Cette possibilité semble peu réaliste vu le pourcentage d'homologie retrouvé entre PME végétale, bactérienne et fongique (Résultats : 38-40), la détection de plusieurs parties de séquences homologues entre ces mêmes PME, ainsi que l'appartenance de la tomate et d'Arabidopsis au groupe des dicotylédones.

Par contre, une différence importante au niveau de la séquence nucléique serait plus probable.

On pourraient également mettre en cause le fragment Pst1 utilisé comme sonde, or il recouvre les zones les plus homologues que l'on observe lors de l'alignement multiple entre PME végétales, fongique et bactérienne (Résultats : 39-40).

Afin de mener à bien cette expérience, il serait donc nécessaire d'effectuer des hybridations avec la sonde utilisée pour le criblage sur de l'ADN génomique d'*Arabidopsis* digéré par diverses enzymes et ainsi déterminer les conditions optimales d'hybridation entre le génome d'*Arabidopsis* et l'ADN génomique de tomate.

Il serait également interessant de réaliser ces mêmes expériences d'hybridation avec les deux sondes génomiques produites, le fragment entier et génomique permettrait peut être une meilleure hybridation lors du criblage.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Afin de pallier le manque d'informations concernant la localisation (Chamberland, 1991) et l'intervention des pectine méthyl estérases lors du mûrissement (Fischer, 1991), croissance et différentiation, la production d'outils génétiques s'imposait.

Nous avons décidé de produire des sondes génomiques de ces enzymes par amplification PCR chez deux solanaceae : la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). En partant de la séquence cDNA de PME2_LYCES (Ray, 1988), nous avons obtenu un produit d'amplification par couples d'amorces et par végétal. Il serait interessant de les séquencer et d'établir une carte de restriction pour chacun afin de les caractériser.

Ne sachant pas si nous avons amplifié plusieurs gènes de pectine méthyl estérases ou un seul dans ce type d'expérience, il serait interessant de réaliser une série d'amplifications avec des couples d'amorces choisis dans la séquence non codante de la protéine mature.

Il serait également productif d'isoler un ou plusieurs clones cDNA et génomiques de pectine méthyl estérases chez Arabidopsis thaliana par criblage de banques avec les produits d'amplifications obtenus. Cela permettrait une étude plus aisée des phénomènes de traduction et transcription afin d'expliquer l'action de ces enzymes, leur localisation et le moment où elles s'expriment.

En effet, la connaissance de la régulation de transcription des pectine méthyl estérases et leur intervention dans le mûrissement du fruit pourraient servir à contôler ce phénomène et donc permettre par exemple une moindre perte lors des transports, une production indépendante des saisons...

5. **BIBLIOGRAPHIE**

- Albersheim P. and Darvill A. (1985) Les oligosaccharines. Pour la science 11 : 18-26
- Ampe F. (1990)
 Les techniques d'extraction de l'A.D.N.
 Le Technoscope de Biofutur 33 : 1-7
 Biofutur 86.
- Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K. (1992)
 Molecular cloning of P.C.R. products.
 Current protocols in molecular biology 2 : 15.7.1-15.7.6.
- Bertheau Y., Magdidi-Hervan E., Kotoujansky A., Nguyen-The C., Andro T. and Coleno A. (1984)
 Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing, or in titration curves.
 Analytical Biochemistry 139 : 383-389
- Bonierbale M.W., Plaisted R.L. and Tanksley S.D. (1988)
 RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato.
 Genetics 120 : 1095-1103.
- Brett C. and Waldron. (1990)
 Physiology and biochemistry of plant cell walls
 Cell wall structure and the skeletal function of the wall 2 : 22-25
- Carrinton D. M., Auffret A. and Hanke D. E. (1985)
 Polypeptide ligation occurs during post-translationnal modification of concanavalin A.
 Nature 313 : 64-67

- Chamberland H., Ouellette G.B., Pauzé F.J. and Charest P.M. (1991) Immunocytochemical localization of tomato pectinesterase in root cells of tomato plants infected by Fusarium oxysporum f.sp. racidis-lycopersici. Can. J. Bot. 69 : 1265-1274
- Chang C. and Meyerowitz E.M. (1986)
 Molecular cloning and DNA sequence of the Arabidopsis thaliana alcohol dehydrogenase gene.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 1408-1412
- Chaplin M. F. and Kennedy J. F. (1986) Carbohydrate analysis : a practical approach.
- De Vries J.A., Rombouts F.M., Voragen A.G.J. and Pilnik W. (1983) Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. Carbohydrate polymers 3 : 245-258.
- Durand B. (1988)
 Les kits de clonage.
 Le Technoscope de Biofutur 21 : 1-14
 Biofutur 70.
- Ferreira P. C. G., Hemerly A. S., Villarroel R., Van Montagu M. and Inzé D. (1991) The Arabidopsis functionnal homolog of the p34 cdc2 protein kinase. The Plant Cell 3 : 531-540
- Fischer R. L. and Bennett A. B. (1991)
 Role of cell wall hydrolases in fruit ripening.
 Annu. Rev. Plant Molecular Biology 42 : 675-703
- Gould S. J., Subramani S. and Scheffler I. E. (1989)
 Use of the D.N.A. polymerase chain reaction for homology probing : isolation of partial cD.N.A. or genomic clones encoding the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase from several species.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 86 : 1934-1938
- Hall J. L., Flowers T. J. and Roberts K. M. (1982) Cell wall. Plant Cell Structure and Metabolism : 430-472

- Hall J. L., Flowers T. J. and Roberts K. M. (1982) The molecules of cells. Plant Cell Structure ant Metabolism : 43-59
- Hatinguais J. C. (1986)
 Synthétiseurs et séquenceur d'ADN
 Le technoscope de biofutur 6 : 1-18
 Biofutur 50.
- Hilson Pierre. (1986) Transformation de Nicotiana Plumbagilifolia et N. Tabacum par un plasmide Ti porteur du gène d'adénylate cyclase de Saccharomycès Cerevisiae (CYR1). Recherche de séquences homologues de CYR1 chez Arabidopsis Thaliana. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade d'ingénieur agronome.
- Innis M. and Gelfand D. H. (1990)
 Optimization of PCRs.
 PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications. : 3-12

 Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D. and Albersheim P. (1973) The structure of plant cell walls.
 A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components.
 Plant Physiology 51 : 188-196

- Koncz C., Chua N. H., Schell J. (1992) Methods in Arabidopsis reshearch.
- Lee M. and Mac Millan J. D. (1968) Mode of action of pectic enzymes; purification and certain properties of tomato pectinesterase. Biochemistry 7 : 4005-4010

- Leveque C. (1991)

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre le rhamnose, un ose neutre constitutif des pectines des parois des cellules végétales. Mémoire de seconde licence en Sciences Biologiques, FUNDP.

- Liners F., Letesson J-J., Didembourg C and Van Cutsem P. (1989) Monoclonal antibodies against pectin : recognition of conformation induced by calcium.
 Plant Physiology 91 : 1419-1424
- Liners F., Thibault J-F. and Van Cutsem P. (1992) Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodi Plant Physiology 99 : 1099-1104
- Liners F., Van Cutsem P. (1992)
 Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspensioncultured carrot cells.
 Protoplasma 170 : 10-21
- Maniatis, Sambrook, Fritsch (1989) Molecular cloning.
- Markovic O. and Jornvall H. (1986) Pectinesterase : The primary structure of the tomato enzyme. Eur. J. Biochem. 158 : 455-462
- Mc Neil M., Darvill A. G., Fry S. C. and Albersheim P. (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53 : 625-663
- Nari J., Noat G., Diamantidis G., Woudstra M. and Ricard J. (1986) Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. Eur. J. Biochem. 155 : 199-202.
- Pruit R. E. and Meyerowitz E. M. (1986)
 Characterisation of the genome of Arabidopsis Thaliana.
 J. Mol. Biol. 187 : 169-183

67

- Ray J., Knapp J., Grierson D., Bird C. and Schuch W. (1988) Identification and sequence determination of a cDNA clone for tomato pectinesterase.
 Eur. J. Biochem. : 119-124
- Saulnier (1987)
 Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin.
 Thèse à l'université P. Sabatier.
- Saiki R. K. (1990)
 Amplification of genomic D.N.A.
 PCR Protocols : A guide to methods and applications : 13-19
- Seymour T. A., Preston J. F., Wicker L., Lindsay J. A. and Marshall M. R. (1991) Purification and properties of pectinesterase of Marsh White grapefruit pulp. Journal of Agriculture and Food Chemistry 39 : 1080-1085
- Slater A., Maunders M. J., Edwards K., Schuch W. and Grierson D. (1985) Isolation and characterisation of cD.N.A. clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins. Plant Molecular Biology 5 : 137-147
- Smith H. (1977)
 Plant cell walls.
 The molecular biology of plant cells.
 Botanical monographs 14 : 6-23
- Twigg A. J. and Sherratt D. (1980) Trans-complementable copy-number mutants of plasmid CoIE1. Nature 283 : 216-218
- Woodrow H.R. (1990)
 Molecular cloning and expresson of pectin methylesterase genes in Lycopersico esculentum (Tomato).
 Thesis at the Faculty of Purdue University.