

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Criblage immunologique d'une banque d'expression de cals compacts de betterave (*Beta vulgaris* L. *altissima*).

BRIBOSIA, Emmanuel

Award date:
1993

[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.



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

Criblage immunologique d'une banque
d'expression de cals compacts de
betterave (*Beta vulgaris* L. *altissima*)

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

Emmanuel BRIBOSIA
Décembre 1993

Criblage immunologique d'une banque d'expression de cals compacts de betterave (*Beta vulgaris L. altissima*)

BRIBOSIA Emmanuel

Résumé

Les protéines liées ioniquement aux parois cellulaires de cals de betterave normaux (compacts) et habitués (friables) ont été extraites et analysées par électrophorèse. Les profils protéiques ont montré de nettes différences quantitatives entre cals normaux et habitués.

Une protéine particulièrement abondante dans le tissu normal a été électroéluée d'un gel d'électrophorèse puis injectée dans un lapin afin d'en obtenir un polysérum. Ce dernier a été utilisé pour cribler une banque d'expression réalisée dans λ gt11 à partir des ARN messagers des cals normaux.

Un clone immunopositif a été détecté et son insert placé dans le plasmide Bluescript en vue de séquençage. Une séquence de 200 paires de bases a pu être lue dans l'ORF et a montré une forte ressemblance avec des ARN messagers codant pour des peroxydases végétales.

L'abondance d'une peroxydase dans le tissu normal pourrait expliquer certains caractères phénotypiques tel que l'intense lignification propre aux parois de cette souche de cal.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : Professeur P. Van Cutsem

Co-promoteur : Professeur J. Vandenhaute

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
Les parois cellulaires constituent l'ossature du végétal.....	5
Culture in vitro d'explants végétaux.....	6
Cals normaux et habitués de betteraves.....	7
Obtention des souches.....	8
Particularités physiologiques de la souche habituée.....	9
Mécanismes d'adhésion inter-cellulaires.....	11
La lignine.....	11
Les polysaccharides pectiques.....	12
Les protéines.....	13
Fonction des protéines végétales connues.....	13
1. Protéines modifiant les propriétés de la matrice extracellulaire.....	14
Les extensines ou protéines riches en hydroxyproline.....	14
Les protéines riches en glycine.....	15
Peroxydases.....	15
Cinnamyl alcool déhydrogénase.....	15
Callose synthétase.....	16
2. Protéines plus directement impliquées dans la défense du végétal vis-à-vis d'agresseurs.....	16
Les lectines.....	16
Endohydrolases.....	16
Thionines.....	17
Inhibiteurs de protéinases.....	17
3. Protéines reliées à la pathogenèse.....	17
Protéines et adhésion cellulaire.....	17
Moyens d'étude des protéines de la paroi.....	18
MATERIEL et METHODES	20
1.SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE	20
1.1 Souches bactérienne, plasmides et bactériophages.....	20
1.1.1 Souches bactériennes.....	20
1.1.1.1. souche <i>E. Coli</i> Y 1090.....	20
1.1.1.2. souche <i>E. Coli</i> XL1-Blue.....	21
1.1.2. Plasmide bactérien.....	22
1.1.3. Phage.....	24
1.2 Milieux de culture pour bactéries.....	24
1.3 Milieux de culture pour betterave.....	25
2. MÉTHODES RELATIVES AUX PROTÉINES	27
2.1 Extraction des protéines cellulaires pariétales de cals de betterave.....	27
2.1.1. Principe.....	27
2.2.2. Protocole.....	27
2.2 Dialyse des extraits protéiques.....	28
2.2.1. Principe.....	28
2.2.2. Protocole.....	28
2.3. Concentration des extraits.....	28
2.3.1. Principe.....	28
2.3.2. Protocole.....	28
2.4 Dosage des protéines par la méthode de Folin.....	29
2.4.1. Protocole.....	29
2.5 Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-page).....	29
2.5.1. Principe.....	29

2.5.2. Électrophorèse.....	31
2.5.3. Solutions et tampons.....	31
2.5.4. Coloration de protéines séparées sur SDS-PAGE.....	32
2.5.4.1. Bleu de coomassie.....	32
2.5.4.2. Coloration à l'argent.....	32
2.6. Électroélué d'une protéine hors d'un gel de polyacrylamide.....	33
2.6.1. Principe.....	33
2.6.2. Protocole.....	33
2.6.3. Électroélué d'une protéine repérée sur gel de polyacrylamide-SDS coloré au bleu de coomassie.....	33
2.6.4. Récupération de la protéine électroéluée.....	34
2.6.5 Concentration de la protéine en vue de l'immunisation d'un lapin.....	34
2.6.6. Solutions.....	35
2.7 Immunoblot avec un antisérum de lapin immunisé contre des protéines.....	35
2.7.1. Principe.....	35
2.7.2. Protocole.....	35
2.7.3. Solutions et tampons.....	36
3. MÉTHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLÉIQUES.....	37
3.1 Constitution d'une banque de cDNA.....	37
3.1.1 La synthèse de l'ADNc.....	37
3.1.1.1. Préparation des ARNm.....	37
3.1.1.2. Synthèse de l'ADNc.....	37
3.1.2 Insertion de l'ADNc dans le vecteur.....	38
3.2 Technique de criblage immunologique d'une banque de cDNA construite dans le vecteur λ gt11.....	39
3.2.1. Principe.....	39
3.2.2. Culture des <i>E. Coli</i> Y1090.....	39
3.2.3. Estimation du titre de la banque.....	40
3.2.4. Préparation d'un lysat de <i>E. coli</i> pour l'adsorption des anticorps anti- <i>E. coli</i>	40
3.2.5. Criblage de la banque avec le polysérum épuisé.....	41
3.2.6. Purification des phages immunopositifs.....	42
3.3 Extraction de l'ADN de phages.....	42
3.3.1. Principe.....	42
3.3.2. Amplification des phages.....	43
3.3.3. Extraction de l'ADN de phage.....	44
3.3.4. Solutions et tampons.....	44
3.4. Analyse de l'ADN sur gel d'agarose.....	45
3.4.1. Principe.....	45
3.4.2. Migration de l'ADN.....	45
3.4.3. Estimation de la taille.....	45
3.4.4. Estimation de la quantité.....	46
3.5 Restriction de l'ADN.....	46
3.5.1. Principe.....	46
3.5.2. Protocole.....	47
3.6 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	47
3.6.1. Principe.....	47
3.6.2. Protocole.....	47
3.7 Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur.....	48
3.7.1. Principe.....	48
3.7.2. Protocole.....	49
3.8 Transformation bactérienne.....	49

3.8.1. Principe.....	49
3.8.2. Préparation de cellules compétentes.....	49
3.8.3. Transformation	50
3.9 Minipréparation d'ADN plasmidique.....	50
3.9.1. Principe.....	50
3.9.2. Protocole	50
3.10 Midipréparation d'ADN plasmidique (+passage de l'ADN sur colonne Quiagen).....	52
3.10.1. Principe	52
3.10.2. Protocole.....	52
3.11 Séquençage de l'ADN	53
3.11.1. Principe	53
3.11.1.1. Première partie, réactions de séquençage.....	54
3.11.1.1.1. Dénaturation de l'ADN	54
3.11.1.1.2. Appariement (annealing) de l'amorce à la matrice à séquencer	54
3.11.1.1.3. Réactions de séquençage.....	54
a. Réaction de marquage (Pour une réaction).....	55
b. Réaction de terminaison.....	55
3.11.1.2. Seconde partie, électrophorèse.....	56
a. Solution pour le gel d'électrophorèse.....	56
b. Polymérisation du gel	56
c. Démoulage du gel.....	57
RÉSULTATS	60
1. comparaison des profils électrophorétiques des protéines pariétales de cals normaux et habitués.....	60
2. Analyse des extraits protéiques par western blot.....	61
3. Obtention d'un antiserum dirigé contre une protéine éluée d'un gel de polyacrylamide	63
3.1. Immunodétection de la protéine sur les extraits "compacts" et "friables"	64
3.2 Recherche du cDNA codant pour une protéine à partir d'un polysérum dirigé contre cette même protéine.....	64
3.2.2. Criblage de la banque.....	65
3.2.2.1. Épuisement de l'antisérum de lapin de ses anti- <i>E.coli</i>	65
3.2.2.2. Criblage immunologique des plages de lyse.....	66
3.2.2.3. Purification des phages recombinants immunopositifs	66
3.2.3. Analyse de l'ADN extrait des phages recombinants.....	67
4. Clonage de l'insert dans le plasmide Bluescript.....	68
5. Transformation de bactéries XL1-Blue.....	68
6. Préparation de l'ADN plasmidique bactérien en vue du séquençage de l'insert	70
7.1. A partir de l'amorce T7	71
7.2. A partir de l'amorce Reverse	72
7.3. Situation de l'ORF de l'insert (séquence lue à partir du primer Reverse) par rapport à la β -galactosidase.....	72
7.4. Nature de la protéine codée par le cDNA cloné	73
DISCUSSION.....	74
Examen de la peroxydase clonée.....	74

Rôle des peroxydases dans la physiologie des cals	76
L'habituation, une des dernières étapes vers la cancérisation du matériel végétal?	79
Habituation et vitrification.....	81
CONCLUSION.....	82
PERSPECTIVES	84
BIBLIOGRAPHIE	86

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au professeur Pierre Van Cutsem pour m'avoir proposé un tel sujet de mémoire.

Un grand merci au professeur Jean Vandenhoute pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, à Thierry Coche ainsi qu'à tous les membres du labo de génétique moléculaire et de biotechnologie théorique.

Toute ma reconnaissance au professeur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir permis de profiter des compétences des membres de son labo. Je pense en particulier à Anne Tibor pour sa disponibilité et sa jovialité ... Merci également à Deborah , Pascale et Michel , Long , Philippe, et j'en oublie certainement.

Merci à Guy et à Anne pour le réconfort qu'ils ont apporté à mes lapins ... Je pense également à D. Van Acker pour la qualité de ses photographies.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les parois cellulaires constituent l'ossature du végétal

Le maintien d'une morphologie déterminée permettant la répartition des fonctions vitales en divers endroits de l'organisme est permis chez le végétal par le développement d'un tissu de soutien conférant une rigidité à l'ensemble. Cette superstructure est assurée chez les plantes par les parois primaires et surtout secondaires de leurs cellules. Ces dernières, turgescentes par la présence d'une grande vacuole, sont étroitement associées entre elles et assurent ainsi la cohésion des tissus. Au lieu d'être constituée principalement de protéines comme chez les animaux, le composant structural majeur de la matrice extracellulaire végétale est représenté par les polysaccharides: Ceci résulte probablement d'une stratégie évolutive orientée par les quantités limitantes en azote dans l'environnement occupé par les plantes. Les polysaccharides pariétaux des cellules végétales comprennent une très grande variété de monomères, lesquels peuvent être reliés les uns aux autres via divers types de liaisons, ils peuvent se brancher, être méthylés ou acétylés, et même être reliés de façon covalente à d'autres composants de la paroi tels des protéines, des composés phénoliques comme la lignine, etc. Une telle complexité chimique n'a pas manqué d'intriguer les chercheurs et beaucoup de données concernant les polysaccharides pariétaux ont pu être accumulées.

Il existe néanmoins un domaine peu étudié et mal compris, celui des mécanismes par lesquels les cellules adhèrent entre elles. On connaît une série de protéines d'adhésion chez les cellules animales. On ignore par contre presque tout de la contribution des composants protéiques de la paroi à l'adhésion intercellulaire chez les plantes.

Cultiver des végétaux entiers afin d'en étudier les mécanismes d'adhésion intercellulaire n'est pas chose facile. Heureusement,

le problème peut être simplifié grâce à une propriété caractéristique du règne végétal : la totipotence des cellules.

La totipotence des cellules végétales signifie qu'elles ont la possibilité de se dédifférencier puis de redonner une plante entière si les conditions de culture y sont propices. En jouant sur la balance hormonale du milieu, il est possible d'amener des fragments de plantes à proliférer de façon anarchique, telle une tumeur, et d'éviter l'organogenèse (redifférenciation des cellules en une nouvelle plante).

Ces amas de cellules relativement peu différenciées (on y trouve parfois des cellules organisées en éléments conducteur), appelés cals, constituent un matériel d'étude facilement manipulable. Les cellules, bien que physiologiquement dédifférenciées pour la plupart, possèdent encore une paroi de composition fort voisine à celle des cellules parenchymateuses de la plante-mère.

Culture *in vitro* d'explants végétaux

Contrairement aux organismes végétaux intacts, les explants cultivés *in vitro* requièrent la présence de régulateurs de croissance dans leur milieu de culture. En jouant sur la balance hormonale, il est possible d'induire à partir de virtuellement tout fragment végétal, l'apparition de cals.

Les principales hormones impliquées dans la prolifération d'un cal sont les auxines (AIA ou acide indole acétique, 2,4-D ou acide dichlorophénoxyacétique) et les cytokinines (dont la kinétine ou furfuryl aminopurine et la BAP ou benzylaminopurine). Ces deux classes de régulateurs de croissance sont déterminantes dans l'orientation de l'organogenèse *in vitro*. Un rapport élevé entre auxines et cytokinines induit la rhizogenèse. Si le rapport s'inverse, le bourgeonnement adventif est stimulé. La callogenèse semble favorisée par des concentrations voisines en auxines et cytokinines mais cela est loin d'être une généralité.

Le choix du type de régulateur de croissance et de leur rapport entre eux se base principalement sur des constatations empiriques

Il est toutefois clair qu'une teneur élevée en 2,4-D dans le milieu de culture, est une condition suffisante pour déclencher la prolifération anarchique des cellules. Le 2,4-D est en effet une auxine de synthèse bien connue comme étant un puissant antagoniste de l'organogenèse et de la différenciation en général.

Beta vulgaris L.altissima, la betterave sucrière est l'une des rares plantes connues pouvant être à l'origine de cals dits habitués, c'est à dire se développant en absence de régulateurs de croissance exogènes. Une modification épigénétique entraîne la dérégulation des gènes codant pour les enzymes de synthèse des hormones végétales. Ces cals habitués de betterave semblent devenus irréversiblement non organogènes. Les caractéristiques morphologiques et physiologiques de ces cals habitués font penser à un tissu vitrifié.

L'hyperhydricité ou vitrification, caractérise les anomalies morphologiques et désordres physiologiques affectant des pousses propagées *in vitro*.

De telles cultures hyperhydriques ont un aspect translucide, friable, hypolignifié et moins chlorophyllien (vert) que des structures normales. On considère l'hyperhydricité comme résultant d'une réponse adaptative à un stress chimique ou physique tel qu'un déséquilibre hormonal, un excès d'humidité ou encore une culture en enceinte close empêchant les échanges gazeux (ce qui peut entraîner l'accumulation d'une hormone comme l'éthylène). Les mécanismes précis déclenchant cet état particulier ne sont pas connus.

Cals normaux et habitués de betteraves

Le laboratoire dispose de deux souches phénotypiques différentes de cals non organogènes de *Beta vulgaris L.altissima* cependant issues d'un même génotype.



Cals normaux (compacts) de betterave.



Cals habitués non organogènes (friables) de betterave.

Le cal normal, exigeant la présence d'auxine et de cytokinine dans le milieu de culture, est chlorophyllien, compact et constitué de grandes cellules (150 à 400 μm) dont certaines, xylémiennes, forment des éléments trachéens bien différenciés avec épaississement secondaire surtout de type réticulé.

La seconde souche de cal, toujours non organogène, est habituée et se développe donc en l'absence de régulateur de croissance. Son aspect est aqueux, blanchâtre et très friable. Les cellules constitutives sont petites (50 μm) et ont l'aspect de protoplastes, se dissociant aisément les uns des autres et dotés d'une paroi cellulaire peu développée (contenu en cellulose et en lignine très faible), (Crèvecoeur et al.1987).

Dépourvu d'éléments différenciés, le tissu friable est composé en grande partie d'agrégats de 10 à 20 cellules plus ou moins arrondies.

Obtention des souches

Les cals habitués de betterave ont été obtenus lors de la même mise au point des conditions de culture permettant la production de bourgeons adventifs à partir de cals dérivant de fragments foliaires de betteraves (De Greef et Jacobs,1979). Un grand nombre de protocoles de culture fut testé : différentes combinaisons hormonales, des périodes variables de traitement au froid (4°C) ainsi qu'un nombre de repiquages défini, permirent l'obtention de trois souches issues d'un même génotype:

une souche habituée organogène, une autre habituée non organogène et finalement un cal normal (exigeant des régulateurs de croissance) non organogène.

Un cal primaire fut d'abord initié, à partir de fragments foliaires incubés cinq semaines à 24°C, sur un milieu de base (BM) contenant de l'acide indole acétique (1mg/l) et de la kinétine (0.1mg/l).

Ensuite, un traitement au froid sur BM + kinétine (1mg/l) + GA₃ (0.2mg/l) pendant neuf semaines suivi d'une régénération de huit semaines sur milieu BM + kinétine (1mg/l) + GA₃ (0.2mg/l)

provoqua le développement d'une structure dépourvue de chlorophylle, semblable à un pétiole, à la base de laquelle se développait un bourgeon vert foncé.

L'entièreté de cette structure fut transférée sur un milieu dépourvu d'hormones (milieu de base) puis repiquée toutes les 4 semaines. Après deux repiquages, une plantule normale émergea. A sa base s'était formé un cal friable aisément détachable de la plantule. Ce cal friable, une fois repiqué, devint vert et engendra des plantules dont certaines avaient un aspect normal. Ces cals (première souche), semblent pouvoir être repiqués indéfiniment sans pour autant perdre leur pouvoir organogène (Gaspar et al., 1988).

L'examen du cal friable obtenu après deux repiquages de la structure non chlorophyllienne montra l'existence de groupements cellulaires ne devenant pas verts après repiquage. Ces amas cellulaires blanchâtres furent également repiqués isolément de la masse du cal plus différenciée.

Ce n'est qu'après trois repiquages que la partie isolée du cal ne montra plus la moindre différenciation. Une lignée de cal habitué non organogène put ainsi être établie (deuxième souche).

Les cals normaux (troisième souche), quant à eux, sont aisément obtenus en induisant la callogenèse à partir de fragments foliaires stériles incubés sur milieu BM + 2,4-D (0.1 mg/l) + BAP (0.1 mg/l). Les cals primaires formés sont ensuite repiqués toutes les 3 - 4 semaines sur ce même milieu de culture. Cette dernière méthode de callogenèse est classique et employée pour de nombreuses espèces végétales. Ainsi, au départ d'un seul et unique génotype, trois types de cals ont été obtenus.

Particularités physiologiques de la souche habitué

Les deux phénotypes, on l'a vu, possèdent une morphologie radicalement différente. Ces différences se manifestent également au niveau physiologique.

Du point de vue enzymatique, le tissu habitué est très pauvre en activité peroxydasique. Cela est aussi bien valable pour la

fraction soluble (cytoplasmique) que membranaire ou pariétale, tant ionique que covalente (Gaspar et al.,1988; Hagège et al.,1991). Cette faible activité est souvent reliée à la lignification déficiente caractérisant la souche habituée (les peroxydases sont connues pour intervenir dans le processus de lignification).

La catalase est une autre enzyme nettement déficitaire dans la souche habituée. Ces deux enzymes, de même que la chlorophylle (également présente en quantité beaucoup plus faible dans la souche habituée) ont comme point commun l'intervention d'un groupe tétrapyrrole dans leur structure. La souche habituée possède manifestement un métabolisme porphyrique perturbé. Son contenu en cytochrome b_5 , cytochrome P450 et en groupements hémiques a été mesuré et représente un pourcentage très faible par rapport à la souche normale. Notons que dans les cellules animales, on a constaté une corrélation entre diminution de l'activité des cytochromes b_5 et P450 et un état d'hypométhylation de l'ADN, ce qui représente en fait une modification épigénétique pouvant expliquer des phénotypes différents.

Une autre caractéristique importante concerne la production d'éthylène, un régulateur de croissance végétale impliqué entre autre dans la réponse au stress. Celle-ci est bien moindre dans les cals habitués que dans les cals normaux. (Hagège et al.,1991). L'éthylène semblerait exercer une action sur les enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire (Roberts et al., 1988), outre l'induction de la maturation cellulaire via l'inhibition de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire (Lieberman et al.,1979).

Contrairement à l'émission d'éthylène, le contenu en polyamines (telles que spermine, spermidine, putrescine) est particulièrement abondant dans les cals habitués, probablement suite à un métabolisme de l'azote perturbé (Hagège et al.,1990). Elles se forment à partir de la putrescine et de la S-adénosylméthionine, la putrescine étant formée par décarboxylation enzymatique de l'ornithine (précurseur de l'arginine). L'abondance de polyamines dans les tissus

méristématiques a déjà été mentionnée (Kaur-Sawhney et al., 1982). Une augmentation du taux de ces polyamines s'observe après repiquage des deux types de tissus et particulièrement avant et pendant la division cellulaire. Le maintien d'un taux élevé de polyamines durant toute la culture du cal habitué corrobore le fait que ce cal est un tissu juvénile ayant une activité mitotique pratiquement permanente.

Une intervention des polyamines spermine et spermidine dans le maintien d'une synthèse active du DNA a été observée par certains auteurs (Cohen et al., 1984; Fracassini et al., 1980; Slocum and Galston; 1985; Tabor and Tabor, 1984). Ces polyamines exercent des effets antagonistes de l'éthylène, à savoir une inhibition de la différenciation cellulaire, et particulièrement de la xylogénèse (Philips et al., 1988).

Mécanismes d'adhésion inter-cellulaires

Nous l'avons vu, la différence essentielle entre les deux types de cals concerne leur consistance. Les parois des cellules du cal normal assurent une cohésion du tissu, alors que les cellules habituées se dissocient aisément les unes des autres.

Trois principales classes de molécules peuvent contribuer à l'adhésion cellulaire : la **lignine**, les **polysaccharides** et les **protéines**.

La lignine

Elle est présente chez les cellules subissant une différenciation pariétale secondaire entraînant leur rigidification lorsque le volume cellulaire final est atteint. La polymérisation des précurseurs de lignine, dont le monomère de base est un phénylpropane, a lieu de manière aléatoire après sécrétion dans la paroi. Elle est entamée par l'action de peroxydases produisant des radicaux phénoxy se condensant en dimères puis en polymères. L'intense lignification des parois cellulaires caractérise nettement la souche normale de la souche habituée. La texture

compacte de la première citée est probablement directement liée à cette abondance de lignine.

Les polysaccharides pectiques

Outre la lignine, la paroi contient de nombreux polysaccharides dont les plus impliqués, selon la littérature, dans l'adhésion intercellulaire, sont les polysaccharides pectiques. Ces polysaccharides contiennent par définition de l'acide galacturonique à côté de rhamnose, arabinose et galactose. Ils sont caractéristiques de la lamelle mitoyenne et de la paroi primaire des dicotylédones principalement. Ils peuvent être liés de façon covalente entre eux ainsi qu'avec des protéines ou d'autres polymères pariétaux.

On distingue trois grands polysaccharides pectiques : les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes I et II. Les premiers cités sont constitués de chaînes d'acide galacturonique reliés par des liaisons α -1,4-. Ces acides peuvent être plus ou moins méthylestérifiés (en C6). D'autres sucres caractéristiques des polysaccharides pectiques peuvent y être branchés. Les homogalacturonanes ayant un faible degré de méthylation peuvent s'associer en dimères.

Les rhamnogalacturonanes I (RGI) sont particulièrement abondants dans la lamelle mitoyenne. Ils se composent d'acide galacturonique et de rhamnose dans un rapport 1:1. Ce polymère peut être relié aux homogalacturonanes (dépourvus de rhamnose) et présenter ainsi une structure tantôt hérissée, tantôt lisse. Un bon nombre de résidus galacturoniques des rhamnogalacturonanes I sont méthylestérifiés et certains peuvent contenir des groupements acétyles estérifiés aux alcools secondaires C2 et C3.

Le rhamnogalacturonane II (RGII), beaucoup moins abondant, représente un composant mineur de la paroi primaire de cellules de dicotylées cultivées en suspension. Il peut être relié aux rhamnogalacturonanes I et aux homogalacturonanes. Sa structure est beaucoup plus complexe que la première forme de ces polysaccharides. Il contient de l'acide galacturonique, rhamnose, arabinose et galactose dans des proportions 10:7:5:5 de même que

des sucres rares tels que l'acide acérique, l'apiose et l'acide 3-déoxy-manno-octulosonique. Les types de liaisons entre les divers sucres sont également différents de celles caractérisant le rhamnogalacturonane I.

Une étude des polysaccharides pectiques présents dans les parois des cals normaux et habitués de betterave montre que le taux d'acétylation de la pectine est plus important pour la souche friable que pour la souche compacte (Liners,F., Van Cutsem,P., Gaspar, Th.,1993). La friabilité des cals habitués de betterave peut ainsi être corrélée avec une augmentation du taux d'acétylation de sa pectine, les teneurs en pectine étant identiques pour les deux souches. Un éventuel lien de causalité entre acétylation et la friabilité du tissu reste toutefois à établir.

Les protéines

Le troisième constituant de la paroi cellulaire pouvant intervenir dans les mécanismes d'adhésion est représenté par les protéines.

Fonction des protéines végétales connues.

Quoique certaines enzymes telles que phosphatases, hydrolases, deshydrogénases, protéases pariétales, etc. aient été étudiées, peu de choses sont connues sur la fonction de la majeure partie des protéines présentes dans la paroi des cellules végétales. Un bon nombre d'entre elles a cependant été séquencé et classé suivant la richesse en certains acides aminés. Les protéines pariétales les mieux étudiées sont celles dont l'expression peut être induite par des stress tels qu'une blessure ou une attaque de pathogène. Les végétaux ne possèdent bien sûr pas de système immunitaire, mais l'évolution les a dotés d'une série de mécanismes leur permettant de se défendre contre les agressions de l'environnement, et à ce titre, les protéines jouent un rôle particulier.

On peut regrouper les protéines pariétales, dont on a observé une fonction en réponse à certains stimuli environnementaux, en trois classes principales (Bowles,D.J.,1990).

1. Protéines modifiant les propriétés de la matrice extracellulaire

Une première classe constitue l'ensemble des produits qui modifient directement les propriétés de la matrice extracellulaire et par là, interviennent dans la défense de la plante en renforçant, restaurant ou modifiant l'environnement pariétal.

Beaucoup de protéines considérées comme structurales dans de vieilles classifications se situent à ce niveau : les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) et les protéines riches en glycine (GRP).

On y trouve également une large variété d'enzymes impliquées dans l'élaboration et la modification d'autres polymères pariétaux tels que la subérine (macromolécule hydrophobe, voisine de la cire), la lignine ou la callose (β -1,3-glucane pouvant être sécrété dans la paroi en cas de stress, par un complexe de synthèse localisé en surface du plasmalemme).

Les extensines ou protéines riches en hydroxyproline

Ces protéines de structure font partie des HRGPs et semblent jouer un rôle central dans l'organisation de la paroi primaire de même qu'être accumulées en réponse à l'invasion d'un pathogène ou suite à une blessure. Toutes les extensines répertoriées sont fortement glycosylées. On retrouve dans la séquence protéique des répétitions périodiques d'un pentapeptide, Ser(Hyp)₄. Les extensines sont synthétisées dans la cellule et sécrétées en monomères solubles dans la matrice pariétale où elles sont insolubilisées dans un réseau tridimensionnel. L'hydroxylation de la proline est un événement post-traductionnel. Les extensines appartiendraient à une famille multigénique; on a cependant observé un splicing alternatif à partir d'un même gène. Nombre d'observations indiquent que les gènes HRGPs seraient régulés au

cours du développement et par des stimuli environnementaux. Les enzymes impliquées dans le métabolisme des extensines sont aussi régulées par ces mêmes stimuli.

Les protéines riches en glycine

Cette famille de protéines pariétales possède un important pourcentage en glycine (60%).

Pratiquement toute la séquence peut être représentée par (Gly-X)_n ou X est fréquemment une glycine. Leur régulation par des signaux développementaux et environnementaux a été montrée pour le pétunia et le haricot. Les taux de transcrits augmentent alors rapidement (en 5 minutes) dans tous les tissus en réponse à une blessure.

Peroxydases

Ces enzymes utilisent l'H₂O₂ pour de nombreuses oxydations. L'activité des peroxydases peut être corrélée avec des processus de croissance, de développement et de défense. Ces enzymes sont étudiées chez les plantes supérieures depuis de nombreuses années pour leur fonction dans l'élimination de l'H₂O₂, ainsi que pour leur capacité d'inactivation des enzymes sécrétées par des pathogènes.

Cinnamyl alcool dehydrogénase

Les produits de la réaction catalysée par cette enzyme sont les alcools cinnamiques, précurseurs directs dans la biosynthèse des lignines (= phénylpropanes hydroxylés et méthylés). Le gène CAD est activé transitoirement en réponse à un traitement éliciteur conduisant à une augmentation de l'activité enzymatique. La synthèse de lignine peut constituer un obstacle à la pénétration d'un pathogène.

Callose synthétase

Cette enzyme catalyse la formation du glucane β -1,3- appelé callose dont le dépôt dans la paroi cellulaire est connu pour être une réponse au stress. L'activation peut être induite par un traitement des cellules avec le chitosan, un constituant des parois fongiques et de l'exosquelette des insectes. L'efficacité de l'induction est en relation avec le degré de polymérisation du chitosan. Le dépôt de callose est très rapide et est très localisé en réponse à une blessure ou à l'invasion d'un pathogène.

2. Protéines plus directement impliquées dans la défense du végétal vis-à-vis d'agresseurs

La deuxième classe comprend ces protéines qui agissent directement comme facteurs de dissuasion, qui ont des activités anti microbiennes ou qui catalysent la synthèse de produits ayant cette activité. On y retrouve des amylases, des inhibiteurs de protéases, des chitinases, etc.

Les lectines

Ce sont des protéines possédant de nombreux sites de liaison non catalytiques pour les hydrates de carbone. Les lectines végétales font preuve d'une spécificité extraordinaire vis-à-vis de la forme des oligosaccharides. Cette capacité en fait de bons candidats comme médiateurs de la reconnaissance inter-moléculaire. Leur régulation est assez complexe et dépend fortement de leur localisation dans le végétal et de son stade de développement. Leur synthèse en réponse à un stimulus agressif n'a pas encore été observée.

Endohydrolases

Les plus connues sont celles manifestant une activité β -1,3-glucanase et chitinase. Les substrats des enzymes sont les

constituants habituels de la paroi cellulaire de pathogènes fongiques (β -glucanes), des parois de micro-organismes et de l'exosquelette des insectes (chitine). L'expression de ces protéines peut être régulée suivant le développement du végétal ou comme réaction de défense.

Thionines

Les thionines constituent une famille de petites protéines basiques dotées de propriétés toxiques pour de nombreux organismes. Elles auraient ainsi un rôle de protection. Leur accumulation dans certains tissus du végétal peut être induite par un stress ou une attaque de pathogènes.

Inhibiteurs de protéinases

Comme leur nom l'indique, ces enzymes peuvent inhiber diverses familles de protéases. Leur régulation est du même type que les autres protéines étudiées.

3. Protéines reliées à la pathogenèse

Cette dernière classe de protéines comprend des polypeptides dont la synthèse paraît corrélée avec une réponse de défense mais dont la fonction précise est inconnue. Ces protéines reliées à la pathogenèse (PR) furent regroupées à cause de leurs propriétés physico-chimiques. Certaines se sont avérées avoir des activités β -1,3-glucanases et chitinases.

Protéines et adhésion cellulaire

Les fonctions de beaucoup de protéines classées selon une nomenclature désuète (richesse en tel ou tel acide aminé, présence de certains motifs répétitifs dans la séquence) ne sont pas encore identifiées.

Ainsi, peu de choses sont connues quant à la contribution protéique dans l'adhésion des cellules végétales entre elles.

Une meilleure connaissance de ces mécanismes d'adhésion cellulaire peut certainement bénéficier du modèle tissu compact - tissu friable. Nous avons vu que la friabilité des cals habitués est corrélée à une déficience en lignine ainsi qu'une forte acétylation de sa pectine pariétale. On peut se poser la question de savoir si l'état friable (ou compact) peut être relié à la présence d'une ou de plusieurs protéines particulières dans la paroi ?

Moyens d'étude des protéines de la paroi

Diverses approches peuvent être envisagées afin d'étudier les protéines de la paroi à partir du modèle cal compact et habitué.

Une première vérification concerne bien entendu le contenu en protéines des parois des deux tissus. Les cals ayant le même génotype, d'éventuelles différences ne peuvent provenir que de mécanismes de contrôle, internes ou externes, et non pas de l'existence ou de l'absence éventuelle de séquences codantes.

Si l'existence de protéines différentes entre les parois des deux tissus peut être confirmée, la technique du criblage immunologique différentiel peut être envisagée afin de détecter dans une banque d'expression les clones dont l'insert code pour une protéine uniquement présente dans l'une des souches. Pratiquement, l'opération consiste à cribler une banque d'expression réalisée à partir des ARN messagers d'un type de cal, au moyen de deux antisérums dirigés chacun contre les protéines pariétales totales d'un des tissus. On peut, par cette méthode, espérer trouver des clones exprimant un antigène reconnu par un seul antisérum.

Dans l'hypothèse où les protéines seraient présentes dans les deux types de cals mais à des abondances variables, le criblage différentiel ne serait plus possible, les protéines de l'un et l'autre générant des antisérums semblables. Le travail consisterait alors à purifier les protéines dont l'expression serait nettement supérieure dans un type de cal, à obtenir des sérums qui

permettraient alors un criblage immunologique pour détecter les seuls clones correspondant aux protéines choisies.

Un criblage de type génétique consisterait à cribler une banque (banque génomique ou de cDNA) au moyen d'une sonde nucléotidique synthétisée à partir du séquençage partiel d'une protéine isolée d'un gel d'électrophorèse (comme pour la méthode précédente). Des obstacles tels que dégénérescence du code, difficulté d'isoler une protéine pure, etc. devraient cependant être surmontés.

Le choix de l'une de ces méthodes (ou d'une autre) dépend finalement du type de protéines présentes dans les parois des tissus étudiés

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

MATERIEL et METHODES

1.SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE

1.1 Souches bactérienne, plasmides et bactériophages

1.1.1 Souches bactériennes

1.1.1.1. SOUCHE *E. COLI* Y 1090

Cette bactérie est utilisée lors du criblage de la banque d'expression de cal compacts de *Beta vulgaris* établie dans λ gt11. La multiplication des phages dans ces bactéries est en effet accompagnée de l'expression de la séquence interpolée dans le site multiple de clonage du phage.

Le génotype de la souche de *E. coli* Y 1090 est Δ lacU169; proA+; Δ lon; ara Δ 139; StrA; SupF (Trp22::Tn10) (pMC9) , ce qui signifie :

- Une délétion dans l'opéron lactose (Δ lacU169)
- Une mutation lacIq (mutation dans le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose) portée par le plasmide pMC9. Celle ci accroît d'un facteur 10 la puissance du promoteur du gène codant pour le répresseur, ce qui est important lorsque la protéine étrangère est toxique pour la cellule hôte.
- La mutation SupF qui supprime la mutation ambre (UAG) présente dans le gène de lyse S du phage λ gt11. Cette caractéristique rétablit la capacité lytique des phages infectant cette même souche.
- Une déficience pour la protéase lon (Δ lon), ce qui augmente la stabilité d'une éventuelle protéine de fusion. Le site de clonage se situe dans la région carboxy terminale de lacZ' (partie de l'opéron lactose codant pour une sous-unité de l'enzyme β -galactosidase). La séquence nucléotidique étrangère est donc transcrite et traduite en même temps que le gène de la β -gal. Le résultat est une protéine de fusion tout à fait inhabituelle pour la bactérie. La localisation du polypeptide étranger dans la zone carboxy terminale de lacZ' semble contribuer à la stabilité de la protéine de fusion La

protéase lon est une de celles responsables pour la faible stabilité de protéines étrangères ou anormales chez *E. coli*. Ces protéases pourraient entraver l'accumulation suffisante de l'antigène dans des cellules sauvages. D'où l'intérêt d'utiliser des hôtes mutants pour cette protéase.

- Un gène de résistance à la tétracycline porté par le Tn10 situé lui-même dans l'épisome F. Les bactéries perdant leur épisome ne pousseront pas sur un milieu + tétracycline.

- Un gène de résistance à l'ampicilline porté par le pMC9. Ce plasmide porte également le gène *lacIq* codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

1.1.1.2. SOUCHE *E. COLI* XL1-Blue

Cette souche est utilisée pour le clonage d'un fragment de DNA dans un plasmide. Son génotype est *recA1*; *endA1*; *gyrA96*; *thi-1*; *hsd R17*; *SupE44*; *relA1*; Δ *lac*; (F', *proAB*, *lacIq* Δ M15, Tn10)

- *recA1* réduit au millième le taux de recombinaison entre ADN exogène et endogène (entre un plasmide recombinant étranger et le DNA bactérien).

- *endA1* entraîne une diminution du taux d'endonucléases réduisant le risque de dégradation lors de l'extraction d'ADN plasmidique (portant l'insert d'intérêt).

- *gyrA96* est une mutation qui touche la sous-unité A de l'ADN gyrase (la gyrase est une topoisomérase introduisant des super tours négatifs dans un plasmide circulaire relâché).

- *thi-1*. Les bactéries possédant cette mutation requièrent de la vitamine B1 dans leur milieu de culture.

- *hsdR17* est une mutation dans des gènes codant pour les endonucléases de restriction, ce qui évite le découpage de l'ADN exogène.

- *SupE44* est un supresseur de la mutation ambre (comme pour Y1090).

- Chez les mutants *relA1*, la synthèse d'ARNm a lieu mais n'est pas suivie de synthèse protéique.

- Δ *lac*, délétion de l'opéron lactose qui rend la souche incapable de métaboliser le lactose.

L'épisome F' (facteur de conjugaison bactérienne) possède les propriétés suivantes:

- résistance à la tétracycline (Tn10).

- proAB signifie que la souche nécessite de la proline dans son milieu de culture.

- lacIq renforce la production du répresseur de l'opéron lactose.

- lacZΔM15 signifie que l'épisome possède la séquence codant pour la partie carboxy terminale de la β-galactosidase. Ce polypeptide peut s'associer avec l'α-peptide (les premiers acides aminés de la β gal. codés par la séquence communément appelée lac Z). Cette dernière séquence peut être interrompue de manière anodine par un site multiple de clonage (= quelques acides aminés) et se trouve fréquemment dans le vecteur transformant.

Les particularités déjà évoquées de l'opéron lactose sont à l'origine d'un test de détection des recombinants, appelé sélection blanc/bleu. L'opéron lactose est composé de trois gènes: la β galactosidase (lacZ) , une perméase (lacI) et une transacétylase (lacA). L'ensemble est régulé par un répresseur codé par le gène lacI de sorte que la transcription n'ait lieu qu'en présence de lactose et en absence de glucose (répression catabolique). Le répresseur se lie à l'ADN au site opérateur et empêche l'initiation de la transcription de l'opéron. Le gène lacIq, porté par l'épisome F' est caractérisé par la force de son promoteur. La synthèse du répresseur est augmentée d'un facteur dix (lacIq est un lacI muté). Il n'y a donc pas expression des gènes de l'opéron. La répression peut être levée par la présence dans le milieu d'un inducteur naturel, le lactose, ou artificiellement comme l'isopropyl-β-D-galactoside ou IPTG.

1.1.2. Plasmide bactérien

Le plasmide est un vecteur de clonage bien plus maniable qu'un vecteur phagien. C'est dans le plasmide Bluescript que le cDNA fut inséré en vue de son séquençage.

Il s'agit d'un phagemide, c'est à dire un hybride entre un plasmide et un phage, pour lesquels il contient l'origine de réplication adéquate. Les propriétés du phagemide pBluescript (2964 paires de bases) sont :

- Présence d'un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet l'élimination des cellules ne possédant pas ou plus le plasmide. Bien qu'étant présents en grande quantité dans la bactérie (près de 300), les plasmides se font facilement éliminer

par la cellule car la réplication de ces derniers est coûteuse en énergie et leur présence n'est pas vitale en l'absence d'antibiotique.

- Un fragment du gène *lacZ*, à savoir *lacZ'*, portant le promoteur, l'opérateur et une partie du gène *lacZ* et codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase ou α -peptide.

- Un fragment non opérationnel du gène régulateur de l'opéron lactose *lacI*.

Le plasmide Bluescript possède le gène *lacZ'* codant pour l' α -peptide de la β -gal. Lorsqu'un tel vecteur transforme une bactérie XL1-Blue, la complémentation en trans (appelée d'ailleurs α -complémentation) entre l' α -peptide codé par le plasmide (appartenant au vecteur) et le produit du gène *lacZ* Δ M15 porté par l'épisome permet d'obtenir une β -gal. fonctionnelle.

Cette activité enzymatique est mise en évidence par un test coloré. En conditions inductrices (présence d'IPTG) un analogue du lactose, le 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl, β -D-galactopyranoside ou X-Gal est ajouté au milieu de culture et est dégradé par la β -gal. en galactose et 5-bromo, 4-chloro, 3-indole, un composé de couleur bleue. La présence d'une batterie de sites de restriction à l'extrémité N-terminale du gène *lacZ'* n'altère pas la capacité de complémentation de l' α -peptide (phase conservée, conformation enzymatique gardée). Cependant, lors du clonage d'un fragment d'ADN dans un des sites de restriction, il y a disruption du gène *lacZ'* et la complémentation ne se fait plus. Les colonies de bactéries transformées par ce plasmide restent blanches. Ce test permet donc de faire la distinction entre les colonies possédant un plasmide originel ou recombinant.

D'autres vecteurs comme les bactériophages possèdent également un gène *lacZ* contenant un site multiple de clonage. Le même test peut être utilisé afin de repérer les bactéries infectées par des phages recombinants. Dans ce cas, une plage de lyse cernée de bleu sera l'indice d'un phage non recombinant (le centre de la plage reste clair car il n'y a plus la moindre activité enzymatique suite à la lyse très avancée).

L'appellation pBluescript KS vient du fait que la transcription de *lacZ'* se fait dans le sens Kpn1 vers Sac1 (sites de restriction). Un plasmide SK existe également. Le site multiple de clonage (SMC) est flanqué des promoteurs phagiens T3 et T7 permettant la transcription de l'insert dans l'un ou l'autre sens par les polymérases du phage.

1.1.3. Phage

Le bactériophage λ gt11 est un vecteur d'expression à DNA bicaténaire de 43.7 Kb. Ses caractéristiques génotypiques sont : lac5; C1857; nin5; Sam100

- C1857 est une mutation qui rend un répresseur de lyse thermosensible actif à 32 °C et inactif à 43 °C.

- Sam100 est une mutation ambre dans un gène de lyse, la lyse n'est alors possible que dans une souche bactérienne qui supprime cette mutation (mutation SupF chez *E.coli* Y1090).

Le site de clonage qui a servi pour l'insertion du cDNA synthétisé à partir des ARN messagers de cals compacts est le site unique *EcoRI* localisé dans lacZ'. Lorsque des bactéries déficientes pour le métabolisme du lactose et infectées par les phages λ gt11 sont étalées sur milieu contenant du X-Gal + IPTG, les plages de lyse qui se forment apparaissent bleues suite à l'activité de la β -galactosidase.

Les phages recombinants sont identifiés par leur capacité à former des plages de lyse incolores.

1.2 Milieux de culture pour bactéries

- Milieu de Luria - Bertani (LB):

Tryptone.....10 g/L
Extrait de levure.....5 g/L
NaCl.....5 g/L

- Milieu LBC:

idem LB + MgSO₄ 10 mM + Maltose 0.2 %

- Milieu solide:

idem milieu liquide + agar 2 %

- Top agar:

idem milieu liquide + agar 0.7 %

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage (20 minutes à 120 °C)

MgSO₄ et maltose sont ajoutés après autoclavage du milieu, à partir de solutions stocks de 1 M et 20 % respectivement.

- Milieux sélectifs:

Lorsque le milieu de culture autoclavé peut être tenu dans la main (50°C), ajouter l'ampicilline pour une concentration finale de 100 µg/ml. Cet ajout peut également être fait lorsque le milieu est solidifié sur boîte de pétri. Jusqu'à 200 µl peuvent être étalés au râteau sur une boîte de pétri préalablement séchée une heure sous hotte. Cette remarque vaut également pour d'autres solutions.

- Milieux pour la sélection blanc/bleu :

Ajouter au milieu de culture autoclavé, IPTG (0.1 mM final à partir de stock 100 mM filtré : diluer 1000 fois) et X-Gal (4 mg / 100 ml final, à partir d'un stock 2 % filtré : diluer 500 fois)

1.3 Milieux de culture pour betterave

Pour 1 litre :

100 ml de solution A
 200 µl de solution B
 4 ml de solution C
 1 ml de solution D
 5 ml de H₃BO₃

Sucrose 30 g
 Agar 7.5 g

Ajuster à pH 6

Régulateurs de croissance pour les cals normaux:

0.1 mg de BAP (benzylaminopurine) ou 1 ml de stock 0.1 mg/ml (dissoudre dans un peu d'alcool)

0.1 mg de 2,4-D (2,4-dichlorophénoxyacétique acid) ou 0.5 ml de stock 0.2 mg/ml (pour dissoudre, jouer sur le pH)

Contenu des solutions A, B, C et D :

Solution A : pour 1 litre. Aliquoter par 100 ml et congeler.

NaH₂PO₄ . H₂O2.5 g
 KCl.....6 g
 (NH₄)₂ SO₄.....4 g
 MgSO₄ . 7H₂O.....5 g
 KNO₃.....20 g
 CaCl₂ . 2H₂O.....3 g

Solution B : pour 200 ml (conserver à 4 °C)

H₃BO₃.....620 mg
 MnSO₄ . H₂O.....1680 mg
 ZnSO₄ . 7H₂O.....1060 mg
 KI.....1583 mg
 Na₂MoO₄ . 2H₂O.....25 mg
 CuSO₄ . 5H₂O.....2.2 mg
 CaCl₂ . 6H₂O.....2.5 mg

Solution C : Pour 200 ml (conserver à 4°C)

Na₂ EDTA.....1865 mg
 FeSO₄ . 7H₂O.....1380 mg
 Mélanger à chaud

Solution D : pour 100 ml (aliquoter par 1 ml et congeler)

Inositol.....100 mg
 Thiamine . HCl.....10 mg
 Pyridoxine.....1 mg
 Acide nicotinique.....1 mg

MÉTHODES RELATIVES AUX PROTÉINES

2.1 Extraction des protéines cellulaires pariétales de cals de betterave

2.1.1. Principe

Les protéines pariétales liées de façon non covalente sont aisément détachées de la paroi par l'emploi de solutions salines. Les sels vont neutraliser les charges de la paroi auxquelles les protéines sont ioniquement liées, ce qui libère ces dernières. Cette méthode est non spécifique et d'autres composants de la paroi, principalement des polysaccharides, sont également détachés.

Pratiquement, les cals, placés dans une seringue bouchée, sont mis à tremper cinq minutes minimum dans une solution saline froide (4°C). Une infiltration sous vide permet d'éliminer l'air interstitiel et assure ainsi une pénétration complète de la solution environnante. Une centrifugation à 150 g permet la récupération de l'extrait protéique. L'extraction est réalisée successivement dans de l'eau distillée, du CaCl₂ 100mM, de l'eau distillée et finalement du NaCl 300mM

2.2.2. Protocole (pour 10 g de cals soit environ 2 mg de protéines)

- Infiltrer sous vide pendant 5 minutes dans 10 ml d'eau désionisée froide (4°C). Les cals sont mis dans une seringue de 20 ml au fond de laquelle est déposé un coussin de laine de verre (2-3 mm). Un morceau de parafilm empêche l'eau de s'échapper de la seringue.

- Centrifuger 3 minutes à 150 g max. (enlever le parafilm) puis récupérer l'extrait et le garder à 4°C pendant la suite des opérations d'extraction. Répéter une seconde fois la centrifugation.

- Infiltrer sous vide 5 minutes dans 5 ml de CaCl₂ 100 mM froid.

- Centrifuger 3 minutes et ajouter l'extrait "CaCl₂" aux précédents. Recentrifuger.

- Infiltrer sous vide 5 minutes dans 5 ml d'eau désionisée froide.

- Centrifuger deux fois trois minutes et récupérer les extraits comme précédemment.

- Infiltrer 5 minutes dans 5 ml de NaCl 300 mM froid.
- Centrifuger deux fois trois minutes et récupérer les extraits.

2.2 Dialyse des extraits protéiques

2.2.1. Principe

Les extraits protéiques contiennent des sels provenant de l'extraction et doivent donc être dialysés. L'objectif est double :

- les sels risquent d'interférer avec la migration des protéines lors d'une électrophorèse SDS PAGE,
- les sels entraînent un passage des polysaccharides (solubilisés en même temps que les protéines) à l'état de gel lors de la concentration de l'extrait (= extrait insoluble).

2.2.2. Protocole

- Hydrater préalablement la membrane à dialyse (Spectra/Por Membrane MCWO:3,500 cut off) dans de l'eau à 60°C pendant 10 minutes.

- Dialyser deux fois un minimum de trois heures (à 4°C) dans un volume au moins 100 fois supérieur à l'extrait. Ceci permet idéalement de diluer les sels 10000 fois.

- Récupérer le dialysat (nettoyer les parois intérieures du boudin) et congeler (-20°C)

2.3. Concentration des extraits

2.3.1. Principe

Le système utilisé est le centricon (Centricon-10 4205; 10,000 MW cut off/Amicon)

2.3.2. Protocole

- Nettoyer le centricon stocké dans du méthanol 10 %.
- Ajouter 2 ml d'extrait dans le centricon.
- Centrifuger à 5000 g dans un rotor à angle fixe pendant 90 minutes à 4 °C.
- Il reste environ 200 µl (soit un facteur de concentration de 10).

- Centrifuger 10 minutes à 1000 g le centricon retourné, muni du bouchon récupérateur. Congeler le concentrat.
- Nettoyer les parois du centricon et centrifuger quelques minutes dans les deux sens avec du méthanol 10%.
- Stocker dans cette même solution.

2.4 Dosage des protéines par la méthode de Folin

2.4.1. Protocole

- Le dosage est réalisé en tubes à essai (5ml).
- Placer 0, 25, 50, 100, 200 μ l de SAB 0.1 % dans les tubes à essai. Porter à 200 μ l.
- Placer ces même volumes d'échantillon dans d'autres tubes à essai. Porter à 200 μ l.
- Ajouter 1 ml de réactif A dans les tubes et homogénéiser.
- Ajouter 3 ml de réactif B et chauffer 15 minutes à 50 °C.
- Laisser refroidir à température ambiante.
- Établir la courbe de calibration de la SAB à 625 nm.
- Calculer la concentration de l'échantillon à l'aide des diverses dilutions.
- Refaire le dosage avec des répliqués de la dilutions d'échantillons la mieux située sur la droite d'étalonnage (par exemple le volume d'échantillon ayant une absorbance voisine de celle donnée par 50 ou 100 μ g de SAB 0.1 %).

Réactif A :

Na₂CO₃ 10 % dans du NaOH 0.5M.....10 ml
 Tartrate de K 2 %.....0.5 ml
 CuSO₄.7H₂O 1.2 %.....0.5 ml + 10 μ l H₂SO₄

Réactif B :

Réactif de Folin.....3 ml
 Eau désionisée.....30 ml

2.5 Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-page)

2.5.1. Principe

En présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS), les protéines prennent une charge négative et sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette séparation se fait ainsi selon le

poids moléculaire uniquement (les variations de charge entre protéines sont dissimulées). Le gel est coulé en deux étapes. Un premier gel dans lequel a lieu la séparation des protéines (running gel ou gel de séparation). Puis, au-dessus une zone dite de stacking gel ou gel d'empilement, dont la concentration en acrylamide est plus faible (3%). Le rôle de ce gel est de concentrer les protéines au niveau du front de migration (front bleu) avant la séparation.

Quantités pour deux petits gels

Gel de séparation (running gel) 12 %

Acrylamide/bisacrylamide.....	4ml
Tampon running.....	2.5ml
Eau distillée.....	3ml
APS 1%.....	0.5ml
Temed.....	10 µl

Gel d'empilement (stacking gel) 3 %

Acrylamide/bisacrylamide.....	0.5ml
Tampon stacking.....	1.25ml
Eau distillée.....	2.75ml
APS 1 %.....	0.5 ml
Temed.....	10 µl

Quantités pour deux grands gels préparatifs

Running gel (gel de séparation)

Acrylamide/bisacrylamide.....	40 ml
Tampon running.....	25 ml
Eau distillée.....	33.5 ml
APS 10 %.....	625 µl
Temed.....	75 µl

Stacking gel (gel d'empilement)

Acrylamide/bisacrylamide.....	1.3 ml
Tampon de stacking.....	2.5 ml
Eau distillée.....	6.1 ml
APS 10 %.....	80 µl

Temed.....12 μ l

Le Temed et l'APS (préparé extemporanément) sont ajoutés juste avant de couler le gel car ils démarrent la polymérisation. De l'éthanol est déposé au dessus du running gel afin d'assurer la polymérisation régulière de sa surface. L'alcool est évacué (avec du tampon par ex.) une fois le gel de séparation polymérisé. Le gel d'empilement peut alors être coulé et un peigne assure la formation des puits.

2.5.2. Électrophorèse

Les échantillons sont préparés dans le tampon pour échantillon (bleu) et placés trois minutes à 100 °C (dénaturation des protéines) avant d'être déposés dans les puits. Un étalon de poids moléculaire connu permet l'estimation de la taille des protéines après coloration. La migration est réalisée à 200 V; 100 W; 60 mA pour un ou deux petits gels. 300 V (ou 400 V); 15 W; 75 mA pour un (ou deux) grands gels.

2.5.3. Solutions et tampons

- Tampon running

Tris/HCl 1.5 M pH 8.8

SDS 4 %

- Tampon stacking

Tris/HCl 0.5 M pH 6.8

SDS 4%

- Tampon d'électrophorèse

Tris/HCl 25 mM pH 8.3

Glycine 192 mM

SDS 0.1 %

- Tampon pour échantillon (bleu)

Tris/HCl 250 mM

SDS 10 %

2 β -mercapto éthanol 10 %

Glycérol 50 %

Bleu de bromophénol 0.25 %

-Solution d'acrylamide 30 %, bisacrylamide 0.8 %

-solution de persulfate d'ammonium préparée extemporanément : 1 % ou 10 % pour un petit ou un grand gel respectivement.

- Étalon de poids moléculaire : sérum albumine bovine (66 kD), ovalbumine (45 kD), glycéraldéhyde-3P-déhydrogénase (36 kD), anhydrase carbonique (29 kD), trypsinogène (24 kD), inhibiteur de la trypsine (20 kD), a-lactalbumine (14.2 kD)

2.5.4. Coloration de protéines séparées sur SDS-PAGE

2.5.4.1. BLEU DE COOMASSIE

Après migration, le gel est plongé 20 minutes dans la solution de bleu de coomassie puis décoloré par plusieurs lavages successifs dans la solution de décolorant.

- Solution de bleu de coomassie :
Bleu de Coomassie brillant blue R250 0.25 %
Méthanol 45 %, acide acétique 10 %, eau distillée 45 %
- Solution de décolorant :
Méthanol 30 %, acide acétique 10 %, eau distillée 60 %

Les solutions doivent être préparées le jour même.

- Tremper le gel 30 minutes dans une solution de :
Méthanol 50 %, acide acétique 10 %, eau distillée 40 %
- 30 minutes dans une solution de:
Méthanol 5 %, Acide acétique, 7 %, eau distillée 88 %
- 30 minutes dans une solution de glutaraldéhyde 10 %
- Tremper le gel une nuit dans un grand volume d'eau afin d'éliminer la glutaraldéhyde.
- Le lendemain, tremper le gel dans une solution de dithiothreitol 0.5 mg/100 ml pendant 30 minutes.

- 30 minutes dans une solution de AgNO_3 0.1 %
- Rincer une fois avec un peu d'eau distillée
- Rincer deux fois avec un petit volume de la solution révélateur : Na_2CO_3 3 % (poids/volume) + 50 μl de formaldéhyde par 100 ml de solution.
- Révéler et arrêter dans de l'acide acétique 3 %
- Conserver dans Na_2CO_3 0.03% ou sécher après avoir trempé le gel une heure dans une solution de :
Méthanol 30 %, glycérol 3 %, eau 40 %

2.6. Électroélution d'une protéine hors d'un gel de polyacrylamide

2.6.1. Principe

L'électroélution a pour objectif la récupération d'une protéine spécifique repérée sur un gel coloré au bleu de coomassie. La technique consiste à découper la bande de gel contenant la protéine en question et à la soumettre à un champ électrique afin d'en éluer la protéine (recouverte de SDS).

2.6.2. Protocole

Pour l'utilisation de l'appareil, se référer à la notice accompagnant le BIO RAD MODEL 422 Electro Eluter.

2.6.3. Électroélution d'une protéine repérée sur gel de polyacrylamide-SDS coloré au bleu de coomassie

- L'électrophorèse terminée, le gel est coloré dans une solution de bleu de coomassie préparée extemporanément. La coloration peut nécessiter une heure pour un grand gel préparatif lorsque les protéines sont peu abondantes.

- Décolorer le gel dans une solution décolorante préparée extemporanément.

- Cesser la décoloration dès que la protéine à éluer est visible sur le gel.

- Placer le gel sur une source lumineuse et découper la bande intéressante au scalpel. La conserver dans du tampon d'électrophorèse en attendant l'électroélution.

- Hacher la bande en morceaux de quelques mm et les déposer dans les tubes d'électroélution préalablement fixés sur l'électroéluteur.

- Fixer le courant sur 10 mA par tube utilisé.

2.6.4. Récupération de la protéine électroéluee

- Après trois heures d'élution, arrêter l'appareil et vider le compartiment supérieur de son tampon.

- Vider délicatement les tubes du liquide se trouvant au-dessus de la pastille poreuse.

- Sortir le tube du support et enlever l'embout contenant l'électroéluat.

- Récupérer le liquide bleu se trouvant dans l'embout en agitant afin de décoller les protéines de la membrane.

- Rajouter 100 à 200 μ l d'eau dans l'embout pour récupérer la moindre trace de colorant bleu (= protéines)

- Dialyser dans un boudin de faible diamètre, deux fois deux heures minimum à 4°C dans un grand volume d'eau distillée.

- Congeler l'électroéluat et aliquoter si nécessaire (pour analyse de la protéine par électrophorèse).

2.6.5 Concentration de la protéine en vue de l'immunisation d'un lapin

- Aliquoter l'électroéluat par 150 μ l.

- Porter à 1.5 ml avec de l'acétone (dans un eppendorf).

- Laisser une heure à - 80°C afin de permettre la précipitation des protéines.

- Centrifuger horizontalement 20 minutes à vitesse maximale (température ambiante)

- Éliminer le surnageant

- Placer dans chaque eppendorf, contenant un culot protéique, un volume de PBS (1 fois concentré) tel que le volume des eppendorfs réunis ne dépasse pas un ml.

- Dans un tube, mélanger la solution protéique avec 1 ml d'adjuvant complet de Freund à la même température que la solution protéique. Pour les rappels éventuels, utiliser de l'adjuvant incomplet.

- Homogénéiser la solution pour obtenir une émulsion (consistance pâteuse); utiliser par exemple une seringue de 2 ml.

- Récolter 10 ml de sang deux semaines après le second rappels (premier rappel : 2 semaines après le vaccin, second rappel une semaine plus tard.)

- Laisser coaguler une nuit à 4 °C.
- Découler délicatement le caillot des parois et centrifuger 10 minutes à 2000 g.
- Aliquoter le sérum (par 100 ul par ex.) et congeler.

2.6.6. Solutions

PBS 10 fois concentré.

KH₂PO₄.....5 mM
 NaH₂PO₄.....74 mM
 NaCl.....1.37M
 KCl.....27 mM PH 7.4.

Tampon d'éluion = tampon d'électrophorèse.

Tris/HCl.....25 mM PH 8.3
 Glycine.....192 mM
 SDS.....0.1 %

2.7 Immunoblot avec un antiserum de lapin immunisé contre des protéines

2.7.1. Principe

Dans la procédure du western blot, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide au filtre de nitrocellulose par électrophorèse transverse. Le tampon de blotting contient entre autre du méthanol afin de renforcer les interactions hydrophobes protéines-nitrocellulose. Après blotting, les protéines sont mises en évidence à l'aide d'un antiserum dirigé contre elles et d'un second anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à une peroxydase.

2.7.2. Protocole

- L'électrophorèse terminée, le gel est débarrassé de son stacking et déposé sur un buvard imbibé de tampon, lui même placé sur le support de blotting. Une membrane de nitrocellulose également humidifiée est déposée sur le gel.
- Éliminer la moindre bulle d'air entre le gel et la nitrocellulose. Si la membrane est plus grande que le gel, y indiquer les bords du gel de même que les repères tels que coins coupés (pour l'orientation du gel). Le dépôt de vert de méthyle dans

certains puits 5 minutes avant l'arrêt de l'électrophorèse permet de retrouver les différentes pistes sur la nitrocellulose.

- Placer un deuxième buvard humide sur la nitro. Fermer le dispositif et le placer dans la cuve de tampon.

- Brancher sur 100 V, 90 minutes pour un ou deux petits gels.. Sur 50 V pendant deux heures pour un grand gel. La nitrocellulose se place du côté positif afin d'intercepter les protéines attirées par l'anode.

- Démonter le système et colorer le gel au bleu de coomassie.

- Découper les bandelettes de nitrocellulose correspondant à l'étalon de P.M. et colorer à l'amidoschwartz quelques minutes. Décolorer ensuite (même décolorant que pour le bleu de coomassie.)

- Plonger la nitrocellulose une heure dans une solution de SAB 3 % dans du TBS pour saturer la membrane en protéines.

- Découper la membrane en autant de bandelettes nécessaires et incuber une heure à 37 °C avec l'antisérum dilué dans du TTBS + SAB 1 %. Agiter légèrement.

- Laver 3 fois 5 minutes dans du TTBS sous agitation.

- Incuber 1 heure minimum à 37 °C avec l'anticorps secondaire dilué dans du TTBS + SAB 1 %. Agiter légèrement.

- Laver 3 fois 5 minutes avec du TTBS sous agitation.

- Préparer les solutions de révélation suivantes (durant le dernier lavage) :

- a) 25 ml de TBS + 15 µl de H₂O₂ 30 %

- b) 5 ml de méthanol + 15 mg de HRP (Horseradish peroxydase color reagent)

Conserver ces deux solutions à l'obscurité et les mélanger juste avant la révélation.

- Après la révélation, rincer les bandelettes à l'eau et les conserver dans l'eau avant examen.

2.7.3. Solutions et tampons

- tampon de blotting

- Tris/HCl 25 mM

- Glycine 192 mM

- Méthanol 20%

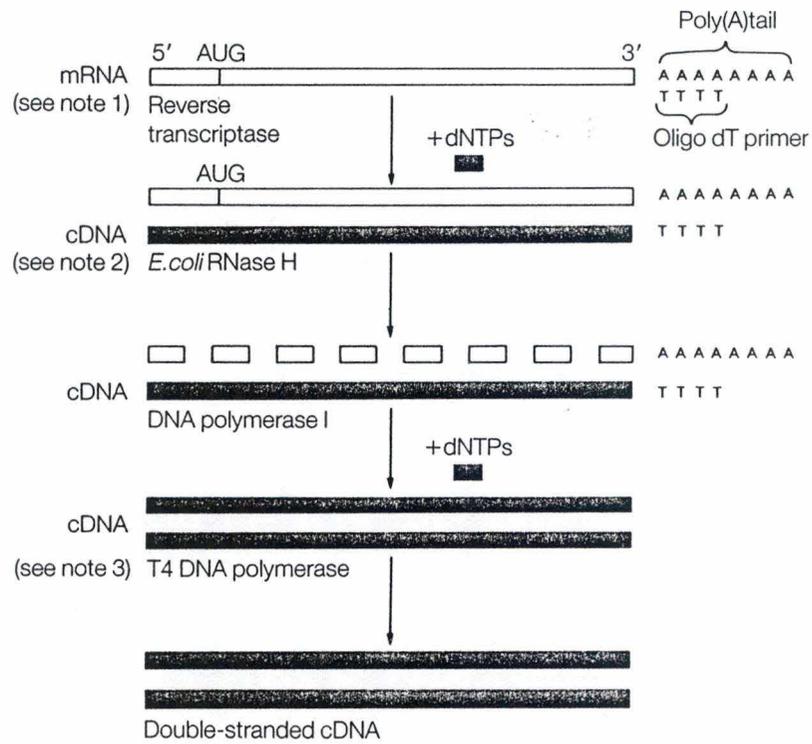
- Tampon TBS 10 fois concentré :

- Tris/HCl 200mM PH 7.5

- NaCl 5M.

- Tampon TTBS :

- idem TBS + 0.05% de Tween 20



Notes

- 1) The first strand cDNA copy is synthesized using reverse transcriptase and an oligo (dT) primer.
- 2) *E. coli* RNase H is used to nick the RNA in the RNA-DNA hybrid. *E. coli* DNA polymerase then efficiently replaces the RNA strand utilizing the nicked RNA as a primer.
- 3) The 3'-5' exonuclease activity of T4 DNA polymerase is used to remove any small remaining 3'-overhangs from the first strand cDNA.

Synthèse du cDNA à partir d'un ARN messager poly-A.

3. MÉTHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLÉIQUES

3.1 Constitution d'une banque de cDNA

L'objectif du clonage est d'isoler de son environnement une séquence codante, de l'intégrer dans une molécule d'ADN vectrice (étape de recombinaison dans l'ADN génomique d'un phage) et de faire transcrire et traduire la séquence dans des cellules bactériennes infectées par les phages recombinants. L'ensemble des phages ayant incorporé une séquence étrangère dans leur génome représente une banque de cDNA dans ce cas-ci, car la séquence incorporée est l'ADN complémentaire aux ARN messagers.

La banque a été réalisée par Sonia de Halleux, à l'aide de l'"Amersham's cDNA Synthesis System Plus RPN.1256 et cDNA Cloning System λ gt11 RPN.1280.

3.1.1 La synthèse de l'ADNc

Par convention, l'ADNc est la copie en acide déoxyribonucléique double brin de l'ARN messenger. Dans le cas des gènes eucaryotes, il présente l'intérêt d'être une source d'information génétique sans intron (exprimable dans une cellule procaryotique) incorporable dans un vecteur. Le succès du clonage d'un ADNc dépend en grande partie de la qualité des ARN messagers isolés.

3.1.1.1. PRÉPARATION DES ARNm

Après broyage des tissus dans des conditions telles que les ARNases ne puissent agir (emploi de phénol par ex.), les ARN totaux sont purifiés. Une méthode consiste à les faire passer sur une colonne d'oligo-dT cellulose qui retient les ARN messagers (polyadénylés) par complémentarité des nucléotides A et T. Une banque d'ADNc est classiquement réalisée à partir de 5 à 10 μ g d'ARN poly-A.

3.1.1.2. SYNTHÈSE DE L'ADNc

- Synthèse du premier brin d'ADN

A partir des ARN messagers poly-A et d'une amorce oligo-dT complémentaire à la queue de poly-A, la transcriptase reverse synthétise le brin complémentaire de l'ARN dans le sens 5' - 3'.

- *Synthèse du second brin*

La méthode employée pour synthétiser le second brin fait intervenir l'action conjointe de la RNAase H et de l'ADN polymérase d'*E. coli*.

La RNAase H est une endoribonucléase qui ne digère l'ARN que lorsque celui-ci forme un hybride avec de l'ADN. Elle introduit dans le brin d'ARN des coupures et ainsi des extrémités 3'OH servant d'amorce à l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Cette dernière remplace alors le messenger par du DNA par "nick translation". Les fragments d'ARN ayant servis d'amorce sont simultanément dégradés par l'enzyme RNAase H. L'avantage de cette technique est de conserver l'information en 3' du messenger et de fournir ainsi des cDNA complets, ce qui n'est pas le cas lorsque l'amorce pour le second brin est créée par repliement terminal du brin néosynthétisé.

3.1.2 Insertion de l'ADNc dans le vecteur (Amersham's cDNA cloning system - λ gt11)

Cette étape passe par l'obtention d'un cDNA ayant des extrémités cohésives *EcoRI* : le cDNA est mis en présence d'adaptateurs (linkers) ayant une extrémité franche et une extrémité pourvue de quatre nucléotides non appariés (un site *EcoRI* coupé).

De nombreux linkers sont mis en présence du cDNA pour éviter la ligation des cDNA entre eux. La self ligation des adaptateurs est empêchée par l'absence de 5' phosphates à l'extrémité de chaque brin protrudant du linker. La T4 DNA ligase se charge de la ligation. Afin de permettre la ligation des extrémités *EcoRI*, la T4 polynucléotide kinase phosphoryle les extrémités protrudantes du cDNA. Les bras du phage sont traités à la phosphatase alcaline pour éviter la self ligation de ces derniers. La ligation des bras avec les inserts donne des molécules concatémériques, coupées en monomères lors de l'encapsulation in vitro (dernière étape).

La création d'une banque de cDNA a ses intérêts et inconvénients par rapport à une banque génomique. Tout dépend de l'objectif poursuivi (voir tableau ci-contre).

3.2 Technique de criblage immunologique d'une banque de cDNA construite dans le vecteur λ gt11

3.2.1. Principe

Des bactéries *E. coli* Y1090 sont infectées par les phages de la banque.

- À 37 °C, une température à laquelle le gène de lyse est actif
- Dans un milieu contenant du maltose. Ce dernier induit chez les bactéries la synthèse d'un transporteur de maltose qui sert de récepteur d'adsorption au phage. L'ajout de magnésium sous forme de $MgSO_4$ favorise l'adsorption des phages.

Lors de la lyse, il y a libération du contenu bactérien qui se retrouve alors au niveau des plages de lyse. L'activation du promoteur *lacZ* se fait cependant après l'apparition des plages de lyse pour éviter les effets toxiques éventuels de la protéine de fusion sur la croissance bactérienne. La présence d'un épitope au niveau des plages de lyse est identifié à l'aide d'un anticorps et d'un anti-anticorps couplé au système de révélation, après imprégnation des plages de lyse (protéines) sur nitrocellulose.

3.2.2. Culture des *E.Coli* Y1090

- Ensemencer 50 ml de LB + ampicilline à partir d'une colonie. Utiliser un flacon ayant un volume tel que la profondeur du milieu soit la plus faible possible. Agiter fortement une nuit à 37°C. L'absorption d'oxygène est vitale pour des bactéries en croissance. Plus la surface de contact milieu-air est grande, plus vite se fera la croissance.

- Le lendemain, récolter les bactéries par centrifugation. Soit 10 minutes à 3000 g, soit 2 minutes en eppendorf.

- Laver le culot deux fois dans du tampon SM et conserver à 4°C.

Notons que lorsque la culture est bien développée, quelques ml peuvent donner plus d'une dizaine de ml de *E. coli* ajustés à une densité optique (D.O.) de 1 à 600 nm. Plusieurs ml de *E. coli* peuvent être centrifugés successivement dans le même eppendorf puis le culot est lavé et resuspendu dans 1 ml de SM par ex. La dilution donnant la bonne D.O. est alors recherchée. Le stock est conservé à 4°C.

L'infection sur une boîte de pétri (9 cm) nécessite 100 μ l de *E.coli* à une D.O. de 1 (600 nm).

3.2.3. Estimation du titre de la banque

- Dans 9 eppendorfs stériles de 1.5 ml numérotés de 2 à 10, ajouter 270 μ l de SM

- Ajouter 30 μ l de la banque dans le tube numéroté "2". Ce tube contient la dilution 10^2 de 1 ml de banque considéré comme volume unitaire.

- Vortexer 10 secondes

- Prélever 30 μ l de la dilution 10^2 et la placer dans le tube numéroté "3".

- Vortexer et poursuivre comme précédemment jusqu'à la dilution 10^{10} .

- Déposer 100 μ l de ces dilutions dans 10 tubes de 10 ml numérotés.

- Y ajouter 100 μ l de la suspension de *E. coli* Y1090 amenée à une D.O. (600 nm) de 1.

- Laisser 20 minutes minimum à 37°C.

- Rajouter 3 ml de top agar liquide (50 °C max.) à chaque tube.

- Homogénéiser

- Étaler le contenu sur boîte de pétri (9 cm) contenant du LBC solide + ampicilline.

- Incuber une nuit à 37 °C.

Le lendemain, les plages de lyse sont bien visibles dans le top agar. Le titre de la banque est exprimé en plages de lyse formées par ml de solution de phages (plate forming unit).

Par exemple, si l'on compte 100 plages de lyse sur la boîte n°8, cela signifie qu'il y a $100 \cdot 10^8 = 10^{10}$ unités formant plage de lyse dans 1 ml de banque.

3.2.4. Préparation d'un lysat de *E. coli* pour l'adsorption des anticorps anti-*E. coli*

Un lapin contient naturellement des *E. coli* (tout comme nous) et par la même occasion des anticorps dirigés contre les protéines de *E. coli*. Or, les plages de lyse contiennent des protéines de *E. coli* car tout le contenu bactérien y est libéré. Ces protéines risquent d'être reconnues par l'antisérum primaire, ce qui allumerait toutes les plages de lyse lors de la révélation. Il faut donc épuiser l'antisérum de ses anti-*E. coli*.

Protocole pour épuiser 30 ml de sérum dilué 500 fois, ce qui donne 60 ml de sérum épuisé dilué 1000 fois :

- Lancer le matin une préculture dans 10 ml de LB à partir d'une colonie.
- Ensemencer l'après-midi 1 litre de LB + ampicilline (choisir un volume tel que la profondeur soit la moindre possible !)
- Le lendemain, lorsque la culture est bien développée, centrifuger à 5000g durant 10 minutes à 4°C.
- Resuspendre les cellules dans 30 ml de :
50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA
- Verser la suspension cellulaire dans des tubes en plastique et y enfoncer franchement la tige d'un sonicateur branché à pleine puissance.
- Conserver les tubes dans la glace et soniquer par intermittence (environ 10 périodes de 20 secondes).
- Centrifuger le lysat à 12000 g pendant 10 minutes à 4 °C.
- transférer le surnageant (contenant les protéines de *E. coli*) dans un nouveau tube est congeler.

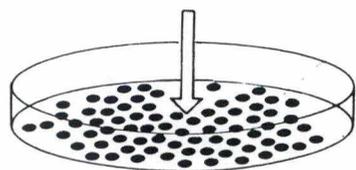
Utiliser le lysat comme suit :

- diluer le sérum 500 fois (par ex.) dans du TTBS + SAB 1 %.
- Y ajouter 1 volume de lysat de *E. coli*.
- Incuber le mélange 4 heures à température ambiante sur agitateur tournant.
- L'antisérum épuisé peut être utilisé ou stocké quelques jours à 4°C avec de l'azide de sodium 0.05 %.

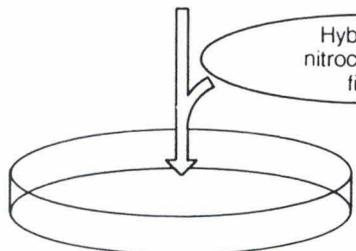
3.2.5. Criblage de la banque avec le polysérum épuisé

- Infecter 100 µl de la suspension d'*E. coli* Y 1090 par 100 µl de la dilution adéquate de phages (plages devenant confluentes).
- Laisser une demie-heure à 37°C pour permettre l'adsorption des phages sur les bactéries. Cela se passe en fait aussi bien à 25 °C qu'à 37 °C.
- Ajouter 3 ml de top agar fondu.
- Étaler sur milieu LBC solide + ampicilline (pétri, 9cm).
- Incuber une nuit à 37 °C.
- Imbiber un filtre de nitrocellulose avec de l'IPTG 10mM (dans une boîte de pétri par ex.) pendant quelques minutes puis laisser sécher (environ 15 minutes).
- Déposer le filtre sur les plages de lyse et laisser imprégner 3 heures à 37 °C.

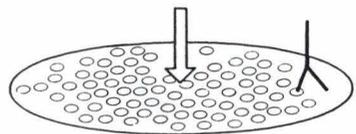
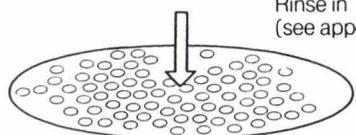
λ gt11 cDNA library



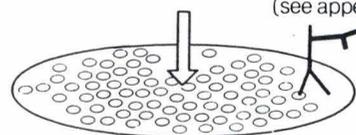
Hybond-C
nitrocellulose
filter



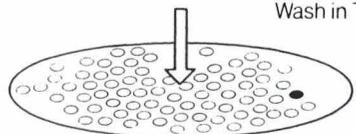
Remove filters
Rinse in TBS
(see appendix)



Wash in TBST
(see appendix)



Wash in TBST



Align filter and original plate
Identify and pick positive plaques
Rescreen to check and isolate clone

1. Plate out cDNA library

Prepare Y1090 plating cells.
Plate out λ gt11 library at the required plaque density, omitting IPTG (and X-gal) so that expression is repressed. Incubate for 3 hours at 43°C for λ gt11 cDNA plaques to develop.

2. Expression induction

Overlay plates with IPTG-impregnated filters. Incubate at 37°C to induce expression.

3. Blocking of non-specific binding

Block filters in 2% BSA or 2% gelatin for 1 hour at room temperature.

4. Immunoscreening

Bind protein specific primary antibody diluted in TBS + 0.2% BSA for 1 hour at room temperature.

Bind peroxidase labelled second antibody diluted in TBS + 0.2% BSA for 1 hour at room temperature.

Incubate filters with DAB substrate + H₂O₂ diluted in TBS to develop positive signals within 10 minutes.

Criblage immunologique d'une banque d'expression établie dans λ gt11.

Veiller à faire des repères (deux marques à 90° par exemple) sur le filtre et sur la boîte aux endroits correspondants. Numéroter filtres et boîtes.

- Retirer délicatement le filtre de nitrocellulose et le rincer 5 minutes dans du TTBS, sous légère agitation.
- saturer la nitrocellulose 60 minutes dans du TBS + SAB 3% à température ambiante.

Pour la suite, suivre le protocole : "immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose".

3.2.6. Purification des phages immunopositifs

- Superposer les plages de lyse à la feuille de nitrocellulose bien orientée.
- Prélever avec une pipette pasteur stérile le top agar au niveau des plages de lyse positives.
- Déposer le boudin de top agar dans 100 µl de SM et laisser diffuser les phages une heure à 37°C.
- Verser quelques µl de chloroforme pour assurer une bonne conservation à 4°C.

A partir de ces prélèvements, un titrage est réalisé puis la dilution donnant des plages espacées de quelques cm est utilisée pour un nouveau criblage (dilution 10^5 ou 10^6 généralement dans le système vu plus haut). On prélève alors un plage positive située dans les environs d'autres plages également positives et l'on crible à nouveau cette suspension. Si les plages obtenues ne sont pas toutes reconnues par le polysérum, prélever et cribler à nouveau.

3.3 Extraction de l'ADN de phages

3.3.1. Principe

La première étape consiste à multiplier les phages de façon à obtenir suffisamment d'ADN. Cette amplification se fait en milieu liquideensemencé avec des *E. coli* infectés.

Les phages amplifiés sont ensuite précipités au polyéthylène glycol. Une centrifugation permet la précipitation des phages. Ces derniers sont dénaturés et l'ADN en est extrait.

3.3.2. Amplification des phages

- Inoculer 50 ml de milieu LBC + ampicilline avec une colonie isolée de *E. coli* Y1090.

- Après une nuit de croissance à 37 °C, la D.O. (600 nm) est mesurée et 10^{10} cellules sont centrifugées puis resuspendues dans 1.5 ml de SM (une densité optique de 1 à 600 nm équivaut à $8 \cdot 10^8$ cellules par ml)

- Mettre les 10^{10} cellules en présence de $5 \cdot 10^7$ pfu.

L'indice d'infectivité est ainsi de 200, c'est à dire 1 phage pour 200 bactéries.

- laisser 30 minutes à température ambiante (adsorption).

- Ensuite, 2 fois 200 ml de milieu LBC préchauffé à 37 °C sont inoculés avec les *E. coli* infectés. Agiter vigoureusement à 37 °C pendant 5 heures.

- Après ce temps d'incubation, on observe une légère turbidité du milieu (aspect floconneux) causée par les bactéries lysées.

- La lyse complète s'effectue par l'ajout de 500 µl de chloroforme (pour 200 ml de culture initiale) sous agitation pendant 30 minutes. Toutes les bactéries sont ainsi détruites et les derniers phages sont libérés.

- Traiter à la DNAase et à la RNAase, chacune pendant 30 minutes (1 µg par ml final) toujours à 37 °C et avec agitation.

- Centrifuger les débris cellulaires à 5000 g pendant 15 minutes.

- Récupérer le surnageant contenant les phages.

- Ajouter un volume de :

NaCl 2M, PEG 8000 20 % dans de l'eau distillée.

- Laisser une nuit à 4°C.

- Centrifuger à 5000g pendant 10 minutes à 4 °C, afin de précipiter le réseau de PEG emprisonnant les phages.

- Resuspendre délicatement dans 15 ml de tampon SM. Le culot est constitué d'un liseré blanchâtre situé au fond et sur la paroi du flacon opposée au centre de rotation.

- La suspension de phages est centrifugée à 30000 rpm pendant 60 minutes (rotor VTi65, Beckman.)

- Le culot de phages (visible) débarassé du PEG est resuspendu dans 3 ml de SM et laissé à 4 °C pendant une nuit.

- L'ADN de phage peut alors être préparé par une extraction au phénol/chloroforme.

- Ajouter à la solution de phages 100 µg de RNAase par ml et incuber 30 minutes à 37 °C.
- Aliquoter la suspension par 0.7 ml maximum en tube de microcentrifugation (eppendorf).
- Extraire deux fois avec 1 volume de phénol-chloroforme :
 - Ajouter un volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) aux aliquotes. et vortexer 1 minute.
 - Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale (13000 rpm)
 - Récupérer la phase aqueuse (supérieure) et la transférer dans un nouveau tube. Éviter de prendre l'interface blanchâtre qui contient les protéines du phage. Recommencer l'opération une seconde fois.
- Ajouter à la phase aqueuse récupérée un même volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1).
- Vortexer une minute et centrifuger 3 minutes.
- Transférer la phase aqueuse (contenant l'ADN) dans un nouveau tube.
- Ajouter 0.5 volume de 7.5 M d'acétate d'ammonium. Homogénéiser.
- Ajouter 2 volume d'éthanol 100 %. (par rapport au dernier volume obtenu). Homogénéiser et placer 15 minutes minimum à -20°C.
- Centrifuger à vitesse max. pendant 10 minutes. Éliminer le surnageant.
- Ajouter 1ml d'éthanol 70 % sur le culot et placer à 0 °C pendant 15 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale (13000 rpm).
- Enlever soigneusement le surnageant et sécher le culot sous vide quelques minutes.
- Resuspendre une nuit le culot dans quelques µl de tampon TE pour obtenir un total de 100 µl.
- Aliquoter et stocker à -20 °C.

3.3.4. Solutions et tampons

- Tampon TE (dans de l'eau distillée stérile)
Tris/HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM
- Solution de phénol:chloroforme:alcool isoamylique 25:24:1.

Solution contenant 1 part de phénol saturé dans le tampon TE à pH 8, et une part de chloroforme:alcool isoamylique dans un rapport 24:1 (distribué par Sigma).

- Solution de chloroforme:alcool isoamylique 24:1 réalisée extemporanément.

3.4. Analyse de l'ADN sur gel d'agarose

3.4.1. Principe

Les acides nucléiques possèdent une charge négative suite à la présence de groupements phosphates. Soumis à un champ électrique, l'ADN migre vers l'anode. Le rapport charge nette électrique et la taille de l'ADN est toujours identique. Chaque nucléotide possède en effet une même charge négative due aux groupements phosphates.

3.4.2. Migration de l'ADN

- Préparer un gel d'agarose 1 % dans du tampon TAE.
- Faire bouillir jusqu'à ce que la solution devienne limpide.
- Laisser refroidir (environ 50 °C)
- Déposer 5 µl de bromure d'éthidium (2 mg/ml) dans un moule en plexiglass et y verser l'agarose fondu. Homogénéiser (pipette)
- Placer un peigne pour former les puits.
- Une fois solidifié, le gel est placé avec son moule dans la cuve d'électrophorèse remplie de TAE. Le gel doit se trouver sous maximum 5 mm de tampon.

- Préparer les échantillons dans la solution d'alourdisseur et déposer dans les puits, côté cathode.

1. Placer dans un tube un volume d'échantillon d'ADN à analyser (ex. 5µl).

2. Ajouter la solution d'alourdisseur (ex. 1.5 µl de 10 fois concentrée.)

3. Porter à volume avec de l'eau distillée.

4. Homogénéiser.

5. Déposer dans les puits.

- Mettre le courant sur 50 mA par exemple.

3.4.3. Estimation de la taille

Dans deux des puits, déposer un étalon de taille (par exemple les étalons II et VIII commercialisé par Boehringer) :

- L'ADN du phage lambda coupé au niveau des sites HindIII, ce qui donne des fragments de taille : 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564 et 125 paires de bases.

- L'ADN du pUCBM 21 coupé par HpaII; DraI et HindIII donne des fragments de taille : 1114; 900; 692; 501;489; 404; 320; 242; 190; 147; 124; 110; 67; 37; 34; 26; 19. Une droite d'étalonnage du log de la taille en fonction de la distance de migration permet d'estimer la taille d'un fragment inconnu.

3.4.4. Estimation de la quantité

La fluorescence d'un fragment est proportionnelle à sa taille mais aussi à la quantité d'ADN présente. Connaissant la concentration d'ADN dans l'étalon, on peut évaluer grossièrement la quantité présente dans l'échantillon. Le dosage de l'ADN peut également se faire via une mesure au spectrophotomètre. L'absorbance de l'ADN (acide nucléique) est mesurée à 260 nm. Sachant qu'une densité optique de 1 correspond à environ 50 µg/ml d'ADN double brin, il est donc possible de mesurer la concentration d'un échantillon. Pour se trouver sur la zone linéaire de la courbe DO/concentration, il est préférable de mesurer des absorbance entre 0.5 et 0.05 DO (diluer l'échantillon). Un rapport de DO entre 260 et 280 donne une idée de la pureté de l'échantillon. Ce rapport doit approcher 1.8 sinon la présence de protéine, n'est pas exclue, ce qui biaise le dosage.

3.5 Restriction de l'ADN

3.5.1. Principe

Les endonucléases de restriction coupent l'ADN double brin au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques en clivant sur chaque brin un lien phosphodiester. Ces enzymes font partie du système de défense bactérien contre les invasions d'ADN étranger.

La majorité des sites spécifiques reconnus par ces enzymes sont des séquences palindromiques. Ces enzymes coupent pour générer des extrémités cohésives (bouts collants, ou plus rarement des bouts francs, en fonction de l'enzyme).

3.5.2. Protocole

Les enzymes utilisées proviennent de la firme Boehringer.

- Enzyme de restriction *EcoRI* et son tampon H contenant:
 - 50mM.....Tris/HCl PH 7.5
 - 10mM.....MgCl₂
 - 100mM.....NaCl
 - 1mM.....DTE
- Déposer dans un eppendorf stérile :
 - L'ADN à restreindre (par ex. 2µl)
 - Le tampon (1/10 du volume final; par ex. 1.5 µl)
 - Porter à volume avant d'ajouter l'enzyme (par ex. 10.5 µl d'eau stérile).
 - L'enzyme de restriction (max. 1/10 du volume final; par ex. 1 µl)
- Incuber une heure et demie à 37 °C
- L'ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.6 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose (Geneclean II kit bio 101)

3.6.1. Principe

L'opération consiste à extraire du gel d'agarose un fragment d'ADN après que celui-ci ait été restreint par une enzyme et séparé par électrophorèse.

Un volume d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt est découpé du gel. L'agarose est fondu et l'ADN est adsorbé sur une matrice de silice dans des conditions de force ionique déterminées.

3.6.2. Protocole

- Séparer les fragments d'ADN après restriction par électrophorèse sur gel d'agarose (1%).
- Visualiser la bande intéressante sous UV et découper le gel à ce niveau à l'aide d'une lame de rasoir. Il est préférable de n'allumer la source que le temps nécessaire pour délimiter la zone à extraire à la lame de rasoir; ceci afin d'éviter la dégradation des extrémités du fragment d'ADN.
- Placer le morceau d'agarose dans un eppendorf et ajouter 3 volumes d'une solution de NaI 6M.

- Incuber 5 minutes à 55 °C pour faire fondre l'agarose et libérer l'ADN.
- Ajouter 5 µl de la solution de Glassmilk. Homogénéiser.
- Laisser 5 minutes à température ambiante (adsorption du DNA).
- Centrifuger quelques secondes à vitesse maximale (13000 rpm dans une microcentrifugeuse) pour culoter le complexe ADN-silice.
- Éliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 10 µl d'eau distillée stérile.
- Chauffer 5 minutes à 55 °C.
- Centrifuger quelques secondes.
- Récupérer les 10 µl de surnageant dans un eppendorf stérile.
- Resuspendre le culot dans 10 µl d'eau et recommencer la dernière étape (rajouter 10 µl d'eau).

On obtient finalement un volume de 20 µl environ contenant l'ADN recherché. L'efficacité de la purification est vérifiée en déposant quelques microlitres de surnageant sur gel. Si l'ADN est peu abondant, il peut n'être visible qu'après dépôt d'un volume allant jusque 10 µl.

3.7 Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur

3.7.1. Principe

Cette étape utilise la T4 DNA ligase pour créer des liens covalents entre deux fragments d'ADN. Il est ainsi possible d'introduire un insert dans un plasmide. En présence d'ATP et d'ion Mg⁺⁺, elle catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'un brin et le phosphate 5' de l'autre. La réaction de ligation est effectuée à 16°C pendant une nuit pour éviter l'agitation thermique pouvant nuire à la réaction de ligation.

3.7.2. Protocole

- Ajouter à l'ADN récupéré lors du Geneclean, le plasmide Bluescript restreint dans la proportion de deux plasmides pour un insert.

Restriction du plasmide; placer dans un eppendorf :

Plasmide entier.....1 μ l (à la concentration voulue)

Tampon1.5 μ l

Eau stérile.....11.5 μ l

Enzyme.....1 μ l

Laisser une heure et demie à 37 °C.

- Ajouter le Tampon de ligation, mettre à volume puis ajouter la ligase.

- Incuber une nuit à 16°C.

3.8 Transformation bactérienne

3.8.1. Principe

Transformer une bactérie signifie y introduire de l'ADN étranger (souvent un plasmide). Pour ce faire, elle doit être perméabilisée par un passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium, qui déstabilise la paroi et la membrane.

La bactérie est alors dite compétente et peut être stockée ainsi à -80 °C. Lors d'un choc thermique, de l'ADN étranger peut pénétrer dans la bactérie fragilisée.

3.8.2. Préparation de cellules compétentes

- Centrifuger 5 minutes à 5000g, 4 °C une culture de 50ml de *E. coli* XL1-Blue en phase exponentielle de croissance dans du LB + ampicilline.
- Resuspendre le culot dans 25 ml de CaCl₂ 250 mM
- Incuber 20 minutes sur glace.
- Centrifuger 5 minutes à 5000g, 4 °C.
- Resuspendre le culot dans 5 ml de CaCl₂ 50mM + glycérol 15% égal au 1/10 du volume du volume de départ.
- Aliquoter et stocker à -80 °C.

3.8.3. Transformation

- Ajouter à 130 μ l de bactéries compétentes la moitié du mélange de ligation (ex. 10 μ l).
- Incuber 30 minutes sur glace.
- Placer 2 minutes à 42 °C.
- Ajouter 500 μ l de LB.
- Incuber 30 minutes à 37 °C. Ne pas dépasser ce temps pour éviter la croissance de cellules dépourvues de plasmides.
- Étaler au râteau 150 μ l sur boîte de pétri contenant du LB + ampicilline + X-Gal + IPTG.

3.9 Minipréparation d'ADN plasmidique

3.9.1. Principe

Une fois centrifugées, les cellules bactériennes sont lysées dans une solution de NaOH/SDS en présence de RNAase. Le SDS dénature les protéines cellulaires tandis que les conditions alcalines entraînent la dénaturation de l'ADN chromosomique. Le temps de lyse est optimisé afin de permettre une libération maximale des plasmides sans pour autant provoquer une lyse complète de la bactérie, ce qui s'accompagnerait de la sortie de l'ADN chromosomique. Ce temps est également limité pour éviter une trop longue exposition des plasmides aux conditions alcalines dénaturantes du milieu. Sous ces conditions, les plasmides finissent par former des super-enroulements dénaturés résistant aux enzymes de restriction. Les mélanges de la suspension avec les différentes solutions de lyse doivent être réalisés délicatement afin d'éviter la cassure de l'ADN génomique attaché à la paroi cellulaire bactérienne. Les protéines, débris bactériens, ADN chromosomique dénaturé et le SDS sont précipités dans des conditions de forte salinité alors que les plasmides, plus petits, se renaturent et restent en solution. La RNaseA, introduite en début de protocole, coupe l'ARN bactérien en petits oligomères.

3.9.2. Protocole

Tampons de lyse :

- Tampon P1 (stocker à 4 °C) :
Tris/HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNase A 100 μ g/ml, pH 8.0

- Tampon P2 :
NaOH 200 mM, SDS 1 %

- Tampon P3 (stocker à 4°C) :
KAc 3.0 M, pH 5.5

- Tampon QBT :
NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, 15 %, éthanol, pH 7.0, 0.15 % Triton X-100

Tampon QC :
NaCl 1 M, MOPS 50 mM, 15 % éthanol , pH 7.0

Tampon QF :
NaCl 1.25 M, Tris/HCl 50 mM, 15 % éthanol, pH 8.0

Tampon TE pH 8.0 :
Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM

Le mélange des solutions de lyse avec la suspension cellulaire se fait en retournant quelques fois le tube à essai.

- Inoculer 5 à 10 ml de LB + ampicilline avec une colonie de bactéries transformées (blanches). Agiter fortement une nuit à 37 °C.

- Récolter les bactéries par centrifugation (en eppendorf, à vitesse maximale pendant 2 à 3 minutes).

- Resuspendre le culot dans 0.3 ml de tampon P1 (+RNaseA).

- Ajouter 0.3 ml de tampon P2, homogénéiser délicatement et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.

- Ajouter 0.3 ml de tampon P3, homogénéiser (en retournant le tube plusieurs fois), puis centrifuger 15 minutes à 4 °C. Récupérer le surnageant soigneusement.

- Précipiter le DNA du surnageant avec 0.8 volume d'isopropanol, pré-équilibré à température ambiante. Centrifuger 15 minutes à 4 °C.

- Lavage de l'ADN : l'ADN se trouve au fond du tube (même s'il n'est pas visible!). Verser environ 100 µl d'éthanol 70 % froid. Centrifuger 10 minutes, éliminer le surnageant et répéter le lavage une seconde fois.

- Sécher l'ADN brièvement sous vide et le redissoudre dans 10 à 20 µl de tampon TE. Conserver l'ADN à -20 °C (aliquoter).

- L'ADN peut être restreint (quelques microlitres) et analysé sur gel d'agarose.

3.10 Midipréparation d'ADN plasmidique (+passage de l'ADN sur colonne Quiagen)

3.10.1. Principe

L'extraction d'ADN est réalisée comme lors d'une miniprep. (à plus grande échelle). Le lysat est ensuite passé sur une colonne échangeuse d'anions. Les conditions de pH et de salinité de la colonne préalablement équilibrée sont telles que seul l'ADN plasmidique est retenu par la résine. L'ARN dégradé, les protéines et autres métabolites s'écoulent hors de la colonne.

3.10.2. Protocole

- Inoculer 50 à 100 ml de LB + ampicilline avec une colonie de bactéries contenant le plasmide à purifier. Agiter fortement une nuit à 37°C.

- Récolter les bactéries par centrifugation à 5000g.

- Resuspendre le culot dans 4 ml de P1 froid. Homogénéiser avec précaution (en retournant les tubes quelques fois).

- Ajouter 4 ml de P2. Homogénéiser et incubé 5 minutes à température ambiante.

- Ajouter 4 ml de tampon P3 froid. Homogénéiser et laisser 15 minutes sur glace en mélangeant de temps en temps.

- Centrifuger 15 minutes à 12000g.

- Récupérer le surnageant et centrifuger dans les mêmes conditions en vue d'obtenir une solution limpide.

- Équilibrer la colonne QUIAGEN TIP 100 avec 3 ml de QBT (laisser le tampon entrer par gravité).

- Déposer le surnageant contenant les plasmides et laisser pénétrer.

- Laver ensuite la colonne 2 fois avec 10 ml de QC.

- Éluer l'ADN avec 5 ml de QF.

- Aliqueter en eppendorf et ajouter 0.7 volume d'isopropanol. Homogénéiser.

- Centrifuger 30 minutes à vitesse maximale.

- Éliminer le surnageant.

- Laver l'ADN en déposant délicatement 500 µl d'éthanol 70 % glacé sur le culot (normalement visible).

- Centrifuger quelques minutes à vitesse maximale.

- Éliminer l'éthanol et sécher le culot sous vide 3 à 4 minutes.

- Resuspendre le culot dans un total de 20 μ l de tampon TE. Aliquoter par 5 μ l par exemple.
- Stocker l'ADN à -20°C.

3.11 Séquençage de l'ADN

3.11.1. Principe

Pour être séquencé, l'ADN doit se trouver sous forme simple brin. La première étape consiste donc à le dénaturer. L'ADN dénaturé est mélangé avec une courte séquence nucléotidique simple brin et complémentaire d'une zone bordant la partie d'ADN à séquencer. Cet oligonucléotide d'une quinzaine de bases trouve par hasard sa séquence complémentaire et peut alors servir d'amorce à une DNA polymérase. En présence de nucléotides radioactifs, l'ADN polymérase prolonge l'amorce dans le sens 5' - 3'. Il s'agit de la réaction de marquage.

Le mélange réactionnel est alors réparti dans 4 tubes marqués G, A, T et C dans lesquels se trouvent ensemble ces 4 nucléotides normaux. Y sont ajoutés, pour chaque tube respectivement, un nucléotide G, A, T ou C dépourvu de 3'OH en moindre quantité que le mélange des 4 bases nucléiques normales (G pour le tube marqué "G", etc.) C'est ainsi que se déroule la réaction dite de terminaison : La polymérase va poursuivre l'élongation du primer à la suite des nucléotides radioactifs déjà incorporés. Cependant, lorsqu'elle aura incorporé un didéoxynucléotide (nucléotide dépourvu de 3'OH), elle ne pourra plus faire de lien phosphodiester 3'OH - 5' phosphate et la polymérisation sera bloquée.

Les fragments présents dans chaque tube auront des longueurs diverses (les didéoxy sont insérés au hasard) mais s'arrêteront tous à une même base nucléique pour chaque tube.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide permet, pour chaque mélange réactionnel G, A, T ou C la séparation des brins néosynthétisés de différentes tailles. Après migration, le gel est appliqué contre un film photographique. La révélation de l'autoradiographie permet alors la lecture, base par base, de la séquence d'ADN synthétisée.

3.11.1.1. Première partie, réactions de séquençage

3.11.1.1.1. *Dénaturation de l'ADN*

- Dans un eppendorf, mélanger :
 - 5 μ g de l'ADN à séquencer dissout dans un total de 8 μ l (porter à volume avec de l'eau)
 - 2 μ l de NaOH 2M
- Vortexer délicatement et centrifuger brièvement si des gouttes restent sur les parois du tube.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Ajouter 3 ml d'acétate de sodium (pH 4 ou 5) et 7 μ l d'eau distillée.
- Ajouter 60 μ l d'éthanol 100 %, mélanger et placer 20 minutes à -80 °C.
- Centrifuger 20 minutes à vitesse maximale et éliminer le surnageant (repérer l'orientation du culot !).
- Ajouter 50 μ l d'éthanol 70 % glacé pour laver le culot.
- Centrifuger 10 minutes et éliminer le surnageant.
- Sécher le culot sous vide (quelques minutes) et le redissoudre dans 7 μ l d'eau distillée.

3.11.1.1.2. *Appariement (annealing) de l'amorce à la matrice à séquencer*

- Ajouter à l'ADN dénaturé (7 μ l), 2 μ l de tampon d'annealing et 2 μ l de solution d'amorce. Incuber 20 minutes à 37 °C pour permettre l'appariement.
 - Laisser minimum 10 minutes à température ambiante.
- Si les réactions de séquençage ne sont pas réalisées le même jour, stocker à -20°C le mélange matrice et amorce appariées.

3.11.1.1.3. *Réactions de séquençage*

- Préparer sur glace la dilution de polymérase :
 - Séquenase : 1 μ l (= la polymérase)
 - PPase : 0.5 μ l
- Total = 8 μ l

Deux microlitres sont nécessaires par réaction de séquençage (une réaction = séquençage d'une zone de DNA dans un sens).

- Préparer le mélange de marquage dilué :

- Mélange de marquage : 2 μ l

- Eau distillée : 8 μ l

Total = 10 μ l

Deux microlitres sont nécessaires par réaction.

- Déposer dans quatre tubes de couleur (G, A, T et C) 2.5 μ l de mélange de terminaison.

a. Réaction de marquage (Pour une réaction)

- Déposer dans un eppendorf :

- ADN apparié (à 0 °C)10 μ l

- DTT 0.1M1 μ l

- Mélange de marquage dilué.....2 μ l

- Nucléotide radioactif (ATP).....1 μ l

- Dilution de séquenase2 μ l

Total = 16.5 μ l

- incuber 5 minutes à température ambiante.

- Faire préchauffer les mélanges de terminaison à 37 °C.

b. Réaction de terminaison

- Retirer les mélanges de terminaison de leur bain.

- Transférer 3.5 μ l de la réaction de marquage dans chaque tube G, A, T et C.

- Incuber 5 minutes à 37 °C.

- Ajouter 4 μ l de solution Stop.

- Stocker à -20 °C si l'électrophorèse n'est pas réalisée de suite.

3.11.1.2. Seconde partie, électrophorèse

a. Solution pour le gel d'électrophorèse

Urée.....	42 g
TBE 10 fois.....	10 ml
Solution d'acrylamide 38 % et bisacrylamide 2 %.....	15 ml
Eau distillée.....	45 ml

Filtrer la solution pour dégazer et éliminer les particules non dissoutes.

Avant de couler le gel, ajouter :

Persulfate d'ammonium 10 %.....	600 μ l
Temed.....	30 μ l

b. Polymérisation du gel

- Nettoyer les plaques de verre à l'eau savonneuse puis à l'alcool.

- Frotter l'une des plaques avec du diméthylchlorosilane pour faciliter le démoulage du gel, le gel adhérant préférentiellement sur l'autre plaque.

- Placer les spacers entre les deux plaques et appliquer un ruban adhésif sur le pourtour des plaques (sur 3 côtés) avant de couler le gel

- Couler le gel dans un coin de façon ininterrompue en tenant les plaques à 30° avec l'horizontale. Éviter l'apparition de bulles d'air.

- Déposer les plaques à l'horizontale et insérer les peignes à l'envers en haut du gel.

- Laisser polymériser.

- Enlever délicatement le ruban adhésif et poser les plaques sur leur support (cuve d'électrophorèse).

- Remplir la cuve avec le tampon.

- Enlever les peignes et rincer la zone de dépôt des échantillons en agitant le tampon (pipette), ceci afin de chasser l'urée.

- Placer les peignes dans le bon sens et s'assurer que les dents du peigne touchent, voire pénètrent légèrement la surface du gel.

- Indiquer directement sur le verre les pistes utilisées (GATC)

- Mettre en route le courant une heure avant la migration.

- Déposer minimum 3 μ l de chaque tube de couleur dans les puits respectifs après le "pré-run".

c. Démoulage du gel

- La migration terminée, la cuve est vidée de son tampon.
- Les plaques sont retirées de leur support et séparées délicatement l'une de l'autre.
- Le gel est arrosé de la solution de fixateur et laissé 15 minutes à l'horizontale.
- Découper un buvard d'une taille supérieure au gel et le déposer délicatement sur ce dernier.
- Retirer le buvard sur lequel adhère le gel et le placer horizontalement, gel vers le haut. Faire disparaître la moindre bulle à l'aide de la solution de fixateur (fin jet).
- Déposer une membrane de cellophane sur le gel et sécher environ deux heures (dans un sècheur de gel).
- Retirer la cellophane, découper le buvard sur le pourtour du gel et le placer dans une cassette d'autoradiographie à l'obscurité et température ambiante.
- Révéler l'autoradiographie.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

1. comparaison des profils électrophorétiques des protéines pariétales de cals normaux et habitués

La différence la plus marquée entre les deux souches de cals est, mis à part leur couleur, leur consistance. Le cal friable est constitué d'amas de quelques cellules lui donnant un aspect désagrégé. Les cellules du tissu normal sont, elles, étroitement associées et ne forment qu'une seule masse. On peut se demander si ces différences morphologiques peuvent être imputées à la présence ou non de certaines protéines pariétales, enzymes ou protéines de structure.

Les protéines pariétales liées de façon non covalente sont aisément détachées de la paroi par trempage des cals dans des solutions salines. Une fois concentré 10 fois et dialysé, l'extrait protéique est dosé par la méthode de Folin. Pour un même protocole d'extraction, l'extrait "friable" contient plus de protéines : environ 800 µg/ml contre 600 µg/ml d'extrait compact concentré 10 fois. Les cellules des tissus friables forment de nombreux amas et il se pourrait que l'extraction des protéines y soit plus efficace.

Une électrophorèse SDS - PAGE a été réalisée avec des extraits "compacts" et "friables" contenant la même quantité de protéines (extraits concentrés 10 fois) : environ 8 µg par puits. Les protéines ont été révélées par une coloration à l'argent, méthode beaucoup plus sensible que la coloration au bleu de coomassie. Les extraits protéiques obtenus à partir de diverses solutions d'extraction (CaCl₂, eau désionisée, NaCl) ont été migrés sur gel et n'ont pas montré de différences dans leur profils électrophorétique. Les protéines extraites sont identiques quelque soit le sel utilisé (ions monovalents ou bivalents). Les solutions

66 kDa
45 kDa
36 kDa
29 kDa
24 kDa
20 kDa
14.2 kDa

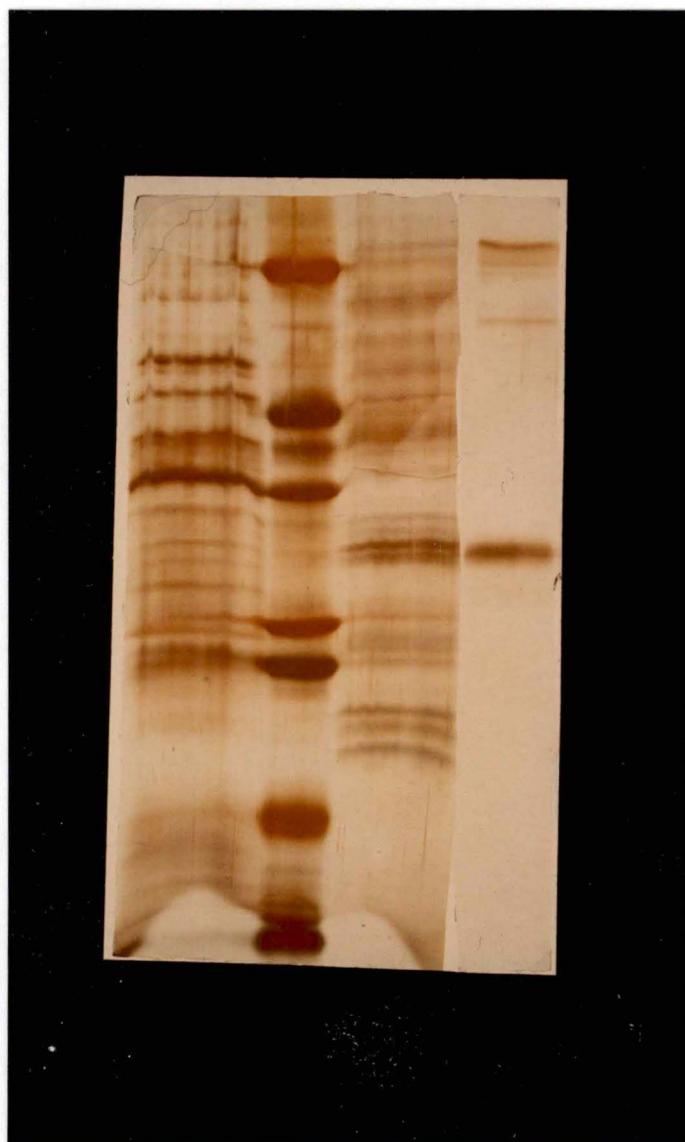


Figure 1.1 : Electrophorèse réalisée à partir d'extraits pariétaux de cals compacts (3^{ème} piste) et friables (1^{ère} piste).
La deuxième piste représente un étalon de poids moléculaire.
La dernière montre une protéine électroéluee d'un gel préparatif d'extraits pariétaux de cals compacts
Le gel est coloré à l'argent.

salines sont, malgré tout, plus efficaces que l'extraction à l'eau désionisée.

Les profils électrophorétiques obtenus sont à première vue très différents mais les variations se sont avérées essentiellement quantitatives.

Ainsi, il semblerait que les mêmes protéines soient présentes dans les parois des deux souches mais que leur abondance dépende du tissu examiné. La technique immunologique du Western blot a permis confirmation de ces résultats.

L'électrophorèse ci-contre montre clairement l'existence de protéines particulièrement abondantes dans une souche ou dans l'autre (Fig 1.1)

2. Analyse des extraits protéiques par western blot

La réalisation d'une électrophorèse n'ayant permis l'observation de protéines définitivement absentes dans une des deux souches, une détection de type immunologique a été envisagée. Deux lapins ont été immunisés chacun avec un extrait pariétal d'un des cals (environ 800 μ g). Les antisérums (dilués 1000 fois) ont été utilisés en parallèle pour révéler les protéines présentes dans deux extraits d'un même cal.

Que l'extrait "compact" soit révélé à partir d'un antisérum "compact" ou "friable", la résolution du western blot n'a pas permis l'observation de différences. Cela est également valable pour la révélation de l'extrait "friable".

En fait, il n'est pas étonnant de trouver toutes les protéines dans les deux souches compte tenu du fait que les génotypes sont identiques. La constatation essentielle est que certaines protéines sont présentes en quantités nettement supérieures dans

un phénotype ou dans l'autre. L'étude de toutes les protéines exprimées différentes devrait permettre d'éclairer les mécanismes menant à la différenciation cellulaire des deux tissus étudiés.

Les protéines pariétales des cals compacts et friables séparées par électrophorèse SDS - PAGE n'ont apparemment jamais été analysées dans la littérature. Il n'était dès lors pas possible, dans le contexte d'un mémoire de fin d'étude, d'entamer l'étude moléculaire des nombreuses bandes qui différaient d'un cal à l'autre. La technique des zymogrammes permet de détecter des activités enzymatiques sur un gel non dénaturant. Outre le fait qu'aucun lien ne puisse être fait entre le profil observé sur une électrophorèse native et dénaturante, aucune indication ne permettait à priori de déterminer s'il y avait une activité enzymatique correspondant à une bande quelconque, et le cas échéant sa nature.

Au vu de ces résultats, même la technique de criblage immunologique différentiel ne put être envisagée, les deux antisérums donnant des profils largement similaires sur un même extrait au cours du western blot.

Il a fallu dès lors aborder le problème au départ des gels d'électrophorèse SDS et se concentrer sur une protéine particulièrement abondante dans un des cal. Ce choix ne pouvait être qu'arbitraire (du point de vue de la nature de la protéine choisie) vu que le seul critère à disposition était l'intensité des bandes observées sur électrophorèse SDS - PAGE

Une banque de cDNA de cals compacts ayant été réalisée en vue de ce travail, le choix s'est porté sur une protéine caractéristique de la paroi cellulaire du tissu normal.

Aux environs de 32 kDa, deux fortes bandes pouvaient être clairement observées sur le profil électrophorétique "compact". Dans l'extrait friable, ces protéines étaient présentes en quantité nettement inférieure. Cette différence d'abondance peut être due à plusieurs facteurs : taux d'expression ou de sécrétion en surface de

la cellule plus intense dans le tissu normal, protéases plus actives dans la souche habituée, etc.

Lorsqu'une électrophorèse d'extraits "compacts" et "friables" fut colorée au bleu de coomassie, les bandes repérées sur le profil "compact" (coloré à l'argent) furent également observables. Cette même coloration appliquée à l'extrait "friable" n'a pu mettre en évidence les protéines en question.

Cette mise en évidence des protéines par une coloration au bleu de coomassie est d'un intérêt évident : les protéines repérées peuvent être isolées par électroélution car ce type de coloration réalisé rapidement ne fixe pas les protéines dans le gel alors que des protéines colorées à l'argent sont fermement emprisonnées dans le gel et sont dans un état de dénaturation très avancé.

Deux possibilités s'offraient alors : soit procéder à un microséquençage de la protéine électroéluée, synthétiser une sonde nucléique et cribler la banque. Soit générer un sérum spécifique de la protéine purifiée, et cribler la même banque d'expression. Outre la facilité qu'il y a à produire un antisérum, la deuxième approche a l'avantage de ne pas utiliser de radio-isotopes, et de fournir une sonde permettant la réalisation de tests ELISA ou de marquages immunocytochimiques (microscopie électronique), toutes méthodes bien maîtrisées.

3. Obtention d'un antisérum dirigé contre une protéine éluée d'un gel de polyacrylamide

Des deux bandes intenses observées à 32 kDa, c'est la bande inférieure qui fut choisie car elle paraissait la moins abondante dans l'extrait friable.

Plusieurs électrophorèses préparatives ont permis d'obtenir la protéine en quantité suffisante pour l'immunisation d'un lapin.

1 2 3 4 5 6 7 8 1' 2' 3' 4' 5' 6' 7' 8'

66 kDa
45 kDa
36 kDa
29 kDa
24 kDa
20 kDa

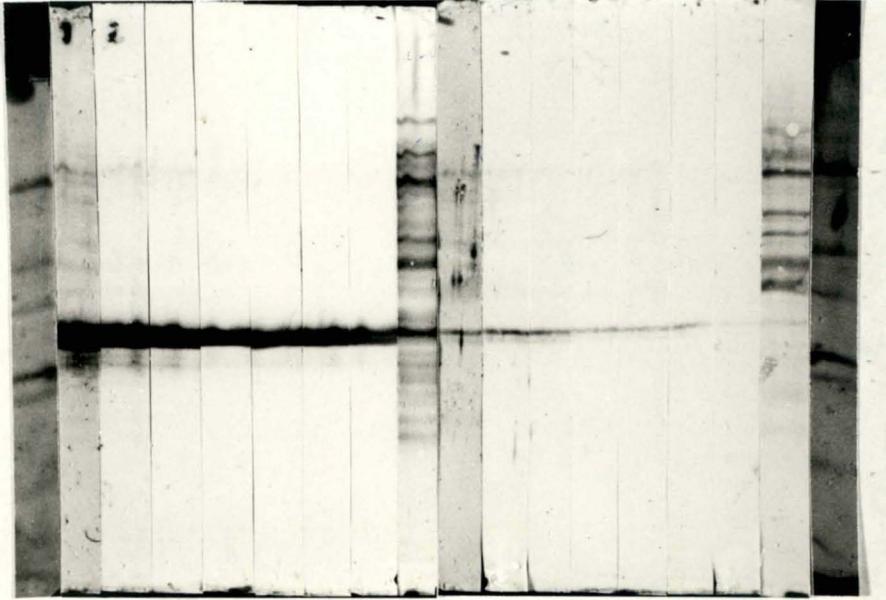


Figure 3.1 : Western blot réalisé sur les protéines pariétales de calcs compacts (de 1 à 8) et friables (de 1' à 8').

Le polysérum dirigé contre la protéine électroéluée a été dilué: 100 fois (1 et 1'); 500 fois (2 et 2'); 1000 fois (3 et 3'); 2000 fois (4 et 4'); 4000 fois (5 et 5'), 8000 fois (6 et 6') et 16000 fois (7 et 7').

Un antisérum dirigé contre la totalité des protéines pariétales de calcs compacts et friables a été utilisé respectivement pour la révélation de 8 et 8'.

Un étalon de poids moléculaire (nitrocellulose colorée à l'amidoschwarts) est présent à gauche et à droite de la photo.

Notons l'abondance des protéines reconnues dans l'extrait "compact" (moitié gauche de la photo).

Plus d'un milligramme d'extrait "compact" concentré 10 fois a été migré dans un grand gel épais de polyacrylamide-SDS. Deux gels furent réalisés pour chaque immunisation (une vaccination suivie de deux rappels).

Après la migration, les gels ont été colorés dans une solution de bleu de coomassie. ils ont ensuite été décolorés le temps nécessaire pour pouvoir observer la protéine en question et la bande fut découpée au scalpel et électroéluée.

La protéine électroéluée n'a pas été dosée afin de ne pas gaspiller de matériel mais une électrophorèse réalisée avec un échantillon a permis d'évaluer la quantité injectée à près de 100 μg par immunisation.

La piste 3 de la figure 1.1 représente la migration d'un échantillon de la protéine électroéluée.

3.1. Immunodétection de la protéine sur les extraits "compacts" et "friables"

La différence d'abondance de la protéine électroéluée dans les tissus normaux et habitués fut confirmée par western-blot (Figure 3.1). La protéine électroéluée est aussi présente dans les extraits "friables" ainsi qu'en atteste l'examen du western blot. Deux bandes fort proches semblent visibles dans l'extrait "compact". L'antisérum reconnaît peut-être deux protéines ayant des épitopes communs (isoenzymes très voisines par exemple) à moins que les deux protéines, voisines dans le gel, aient été présentes dans l'électroéluat suite à une contamination lors du découpage du gel. Ce sont dès lors ces deux protéines qui sont reconnues par le polysérum sur le profil électrophorétique de l'extrait compact.

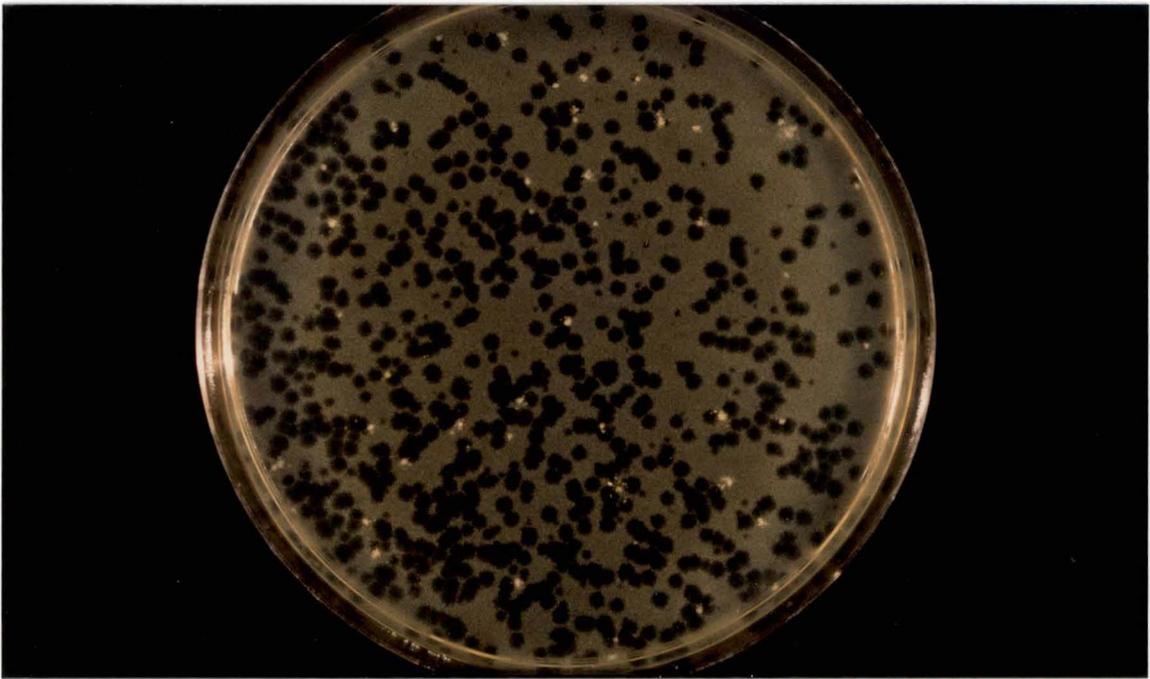


Figure 3.2 : Plages de lyse dans le top agar d'une boîte de Pétri.
Le criblage est effectué avec la dilution de phages donnant des plages de lyse toutes confluentes (plus denses que ci-dessus).

3.2 Recherche du cDNA codant pour une protéine à partir d'un polysérum dirigé contre cette même protéine

La banque de cals compacts fut réalisée à partir des ARN messagers totaux du tissu compact, recopiés en cDNA par la transcriptase réverse. Chaque cDNA fut ensuite inséré dans un génome de λ gt11 pour constituer ainsi une librairie de séquences codantes pour les protéines du cal.

3.2.1. titrage de la banque

Le titre de la banque se donne en nombre de phages par millilitre. Puisque un phage n'est décelable que par la plage de lyse qu'il peut induire dans un tapis bactérien, on parle d'unité formant une plage ou "plaque forming unit" (voir figure 3.2).

Le titre de la banque (100 ml) a été mesuré à plus de 10^8 pfu/ml. La banque étant amplifiée, ce titre n'est pas particulièrement élevé (une bonne amplification peut donner de 10^{10} à 10^{11} pfu/ml).

3.2.2. Criblage de la banque

Calculer un nombre théorique de plages de lyse à cribler n'est pas aisé. Ce nombre dépend en effet de la proportion de l'ARN messager codant pour la protéine étudiée. La protéine éluee étant très abondante dans la paroi du tissu compact, on peut supposer que les ARN messagers correspondants sont également fort nombreux dans la banque. L'expérience montre en général que la

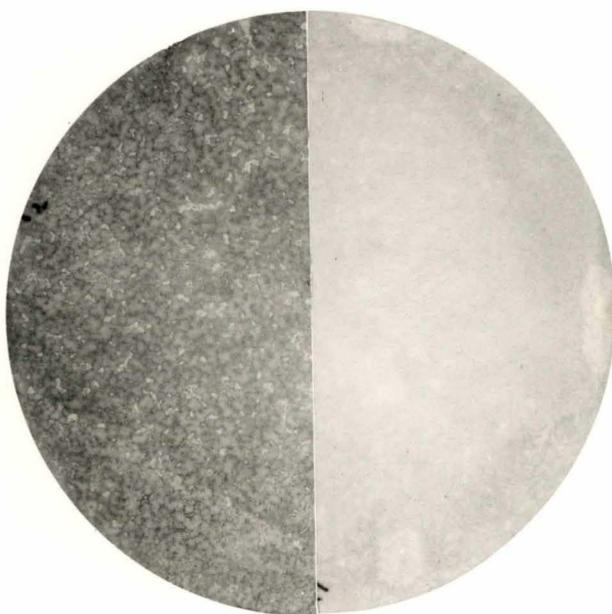


Figure 3.3 : Comparaison entre un criblage réalisé avec un sérum non épuisé de ses anti-*E. coli* (à gauche) et épuisé (à droite). Les plages de lyse sont confluentes et ne peuvent être distinctement observées.

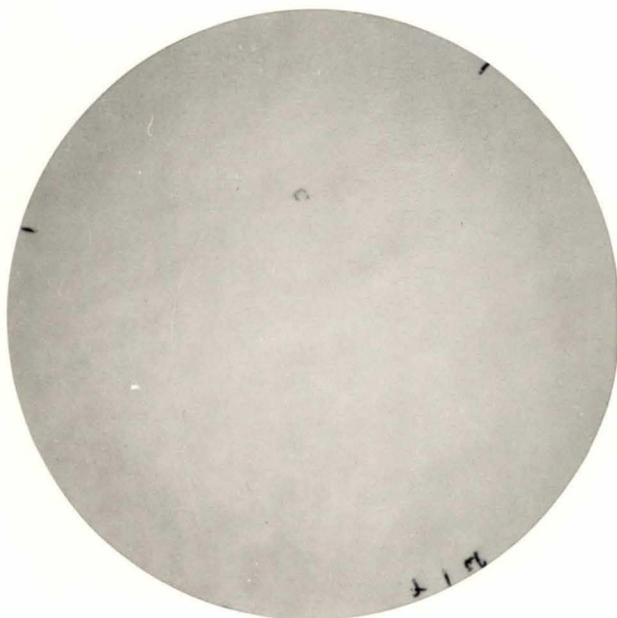


Figure 3.4 : Filtre de nitrocellulose original sur lequel a été détecté un clone nettement positif.

majorité des clones peuvent être retrouvés après criblage d'un nombre de plages allant de cent mille à un million.

3.2.2.1. Épuisement de l'antisérum de lapin de ses anti-*E. coli*

Les plages de lyse sont constituées de *E. coli* lysés. Toutes les protéines bactériennes sont donc présentes sur le pourtour de la plage (au centre, la lyse est tellement avancée que toute macromolécule y est dégradée). Or, le sérum d'un lapin contient naturellement des anticorps dirigés contre des protéines bactériennes. Le lapin possède en effet des *E. coli* dans sa flore intestinale et est immunisé contre les protéines intracellulaires (étrangères) des *E. coli*. Il est donc indispensable d'épuiser l'antisérum du lapin de tous ses anti-*E. coli*. Autrement, toutes les plages de lyse sont révélées positives. L'épuisement a été réalisé en incubant quelques heures un volume d'antisérum dilué 500 fois avec un volume de lysat de *E. coli* (25mg/ml) (voir figure 3.3).

3.2.2.2. Criblage immunologique des plages de lyse

Après une nuit d'incubation à 37°C, des plages de lyse confluentes ont été recouvertes d'un filtre de nitrocellulose imbibé d'IPTG afin d'induire l'expression de la protéine en fusion avec la β -galactosidase. Ces filtres ont été ensuite révélés comme lors de la procédure du western blot.

Un clone nettement immunopositif a été trouvé après criblage de 16 boîtes de pétri, ce qui a représenté le criblage de 20000 plages de lysés (voir figure 3.4). Quatre autres clones suspectés positifs se sont avérés négatifs après un second criblage des plages de lyse purifiées.

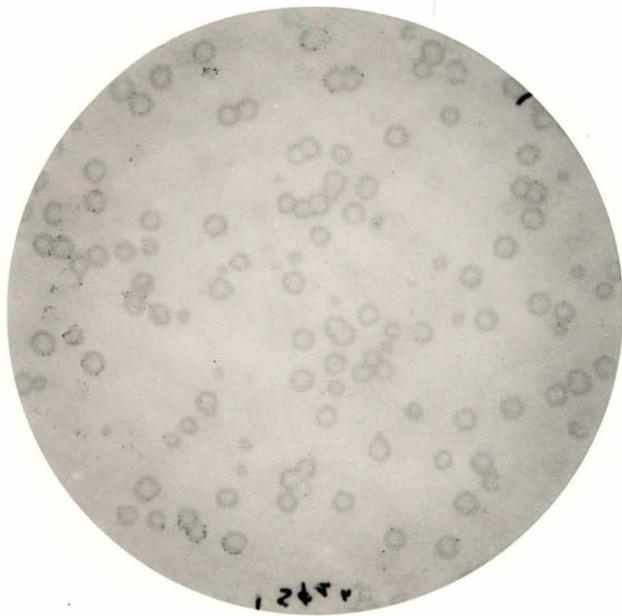


Figure 3.5 : Résultat d'un criblage effectué à partir de phages immunopositifs purifiés.
Toutes les plages de lyse sont reconnues par le polysérum.

3.2.2.3. Purification des phages recombinants immunopositifs

Les plages de lyse positives ont été diluées dans du tampon et titrées. La dilution donnant des plages espacées de 1 cm minimum a été criblée à nouveau. Seul un clone (parmi les 5 trouvés) resta positif après ce second criblage. Ce clone a de nouveau été isolé puis criblé afin d'obtenir 100% de phages recombinants (voir figure 3.5).

3.2.2.4. Effet de l'IPTG et du glucose sur l'expression de l'antigène reconnu par le polysérum

Un criblage de phages immunopositifs purifiés a également été réalisé sans imprégnation du filtre de nitrocellulose avec l'IPTG. L'insert cloné dans λ gt11 est sous la dépendance du promoteur/opérateur de lacZ, lui-même sous la dépendance d'un signal inducteur tel que le lactose ou un analogue (IPTG). En absence de lactose, l'expression de la β -galactosidase - enzyme permettant l'utilisation du lactose comme source énergétique - est inhibée par un répresseur codé par lacI. C'est un système d'économie. Or, l'antigène est exprimé en fusion avec la β -galactosidase. Il ne devrait donc théoriquement pas y avoir d'expression de la protéine de fusion en absence d'IPTG (ou de lactose). Cette expression, bien que plus faible qu'en présence d'IPTG, a lieu néanmoins.

Un criblage réalisé à partir de plages de lyse obtenues sur un milieu contenant 2% de glucose n'a révélé aucune plage positive. C'est le phénomène de répression catabolique : la présence d'une source d'énergie facilement utilisable par la cellule comme le glucose par exemple inhibe fortement la transcription d'opérons

5

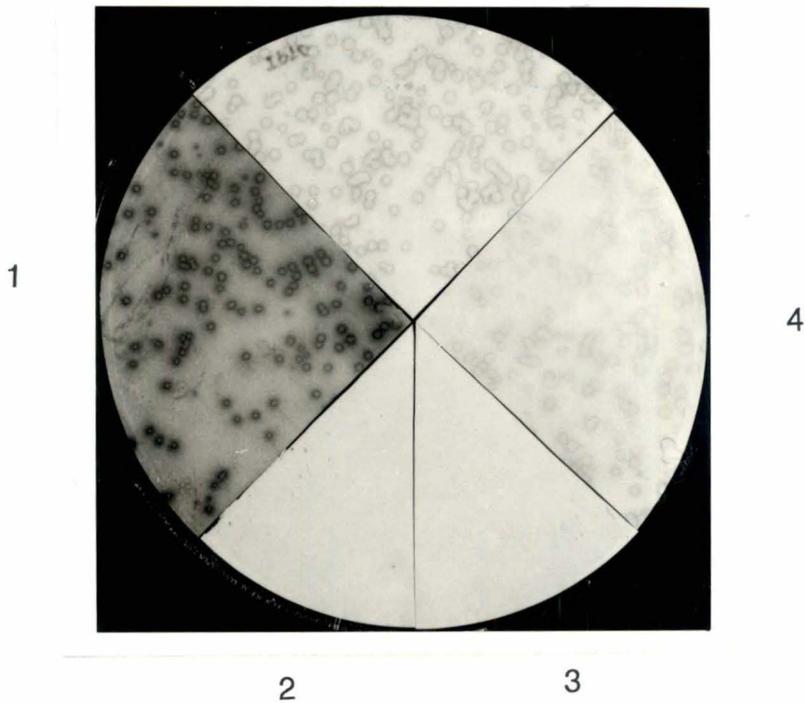


Figure 3.6 : Comparaison entre des criblages effectués à partir de:
(1) phages provenant de la banque (plages de lyse normalement négatives) avec un antisérum non épuisé de ses anti-*E. coli*.
(2) mêmes phages que (1) mais avec un antisérum épuisé.
(3) phages immunopositifs ayant formé des plages de lyse sur un milieu LBC + glucose 2% (répression catabolique).
(4) phages également immunopositifs, sans imprégnation de la nitrocellulose avec l'IPTG.
(5) phages immunopositifs, avec imprégnation de la nitrocellulose avec l'IPTG.

23.130 kb

9.416 kb

6.557 kb

4.361 kb

2.322 kb

2.027 kb

0.564 kb

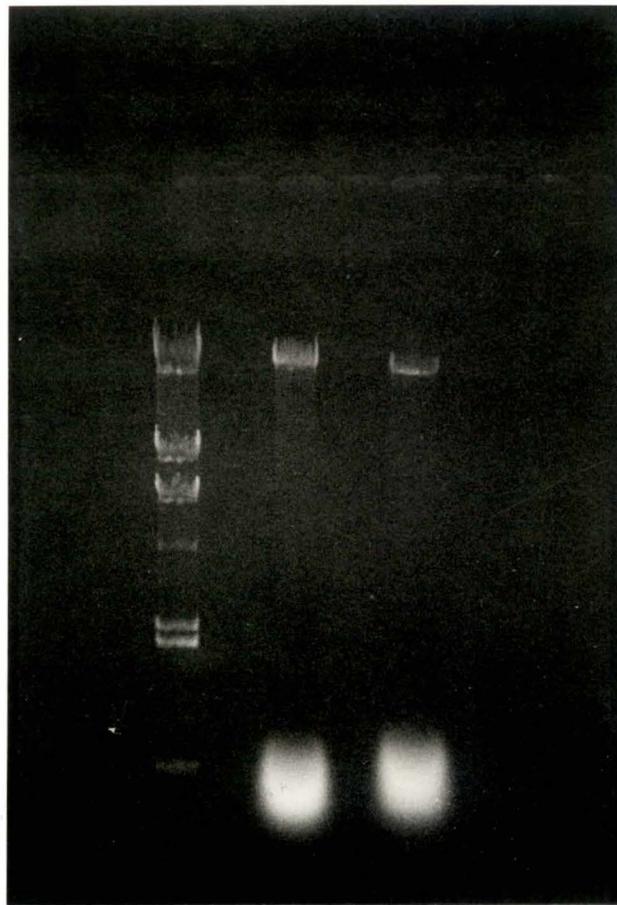


Figure 3.7 : ADN de phage recombinant positif, séparé sur gel d'agarose (les deux pistes de droite).

A gauche, un étalon de poids moléculaire.

Les deux taches blanches dans le bas de la photo représentent de l'ARN.

permettant l'utilisation d'autres sources énergétiques (lactose entre autres).

La figure 3.6 montre l'effet de l'IPTG et du glucose sur le criblage de plages de lyse positives.

3.2.3. Analyse de l'ADN extrait des phages recombinants

Une culture initiée à partir de *E. coli* Y1090 infectés par des phages immunopositifs (10^{10} cellules infectées par $5 \cdot 10^7$ pfu, ce qui représente un rapport d'infectivité de 200) a permis la récolte d'environ 10^{12} phages après 5 heures d'agitation à 37°C. Les $5 \cdot 10^7$ pfu furent obtenues lors d'une première tentative d'amplification des phages sur boîtes de pétri (Maniatis, page 2.66) : $5 \cdot 10^8$ pfu furent ainsi obtenues (dans 50 ml), ce qui n'a pas permis la préparation d'une quantité suffisante d'ADN de phage, visible sur gel d'agarose. L'amplification en culture liquide a dès lors été choisie.

L'ADN des phages, précipités au polyéthylèneglycol, a été préparé par une extraction au phénol/chloroforme.

L'ADN ainsi récupéré et dissout dans un volume de 20 μ l a été séparé sur gel d'agarose (5 μ l). Une bande représentant le génome du phage était visible dans les hauts poids moléculaires (50kb). La quantité totale fut estimée à dix microgrammes maximum (à partir de l'étalon de concentration connue).

La photo ci-contre représente l'ADN de phage après extraction au phénol chloroforme (figure 3.7).

Une restriction *EcoRI* a permis l'excision de l'insert cloné. L'efficacité de la restriction a ensuite été vérifiée sur gel d'agarose : Un fragment de 700 paires de bases environ était



Figure 4.1 : Gel d'agarose préparatif en vue d'extraire l'insert situé en *EcoRI* dans le génome des phages recombinants immunopositifs (sous le puits de dépôt, plus fin).

En bas, une large bande est constituée d'ARN.

La bande obscure dans le gel représente l'endroit où se trouvait le fragment interpolé entre les bras du phage.

vaguement visible en plus des bras du phages sur le gel (la photo n'est pas représentée ici car la bande est pratiquement invisible).

4. Clonage de l'insert dans le plasmide Bluescript

Une fois l'efficacité de la restriction confirmée, la totalité de l'ADN de phage restreint a été déposé sur la largeur d'un petit gel d'agarose 1 % afin de séparer les fragments. La bande correspondant à l'insert fut découpée (voir figure 4.1) et l'ADN purifié par la méthode GeneClean. La quantité totale d'insert purifiée selon cette méthode fut évaluée à 20 ng. L'incubation du fragment purifié avec des plasmides Bluescript KS restreints (2 plasmides pour un insert) a été réalisée en présence de la T4 DNA ligase.

Parmi les constructions obtenues sous l'action de la ligase, il peut se trouver des plasmides contenant l'insert dans leur site de clonage (plasmides recombinants) et des plasmides recircularisés sans insert (majorité).

5. Transformation de bactéries XL1-Blue

Afin d'identifier les plasmides recombinants des autres et pour amplifier cette construction, des bactéries XL1-Blue ont été transformées par la méthode au calcium avec le mélange de ligation.

Ces bactéries sont rendues compétentes suite à un traitement fragilisant leur paroi. Un choc thermique permet alors l'entrée des plasmides dans les cellules bactériennes.



Figure 5.1 : Colonies de bactéries XL1-Blue transformées par le plasmide pBluescript.

Les bactéries ont ensuite été étalées sur boîtes de pétri (4 boîtes de 9 cm de diamètre) contenant de l'ampicilline (sélection des cellules transformées), du X-Gal et de l'IPTG (pour détecter les bactéries contenant un insert dans leur site multiple de clonage). Seules les bactéries transformées poussèrent sur le milieu sélectif car le plasmide apporte à la bactérie le gène de résistance à l'ampicilline. La distinction entre les bactéries transformées par un plasmide recombinant ou non est possible grâce au test de sélection colorée blanc/bleu.

La photo ci-contre (figure 5.1) représente une boîte de pétri sur laquelle sont étalées les bactéries transformées. L'aspect bleuté des colonies est dû à la métabolisation du X-Gal par la β -galactosidase non disruptée dans la majorité des colonies (transformées mais non recombinantes).

La plupart des colonies qui se développèrent étaient bleues. Une observation attentive a permis cependant le repérage d'environ 1 % de colonies blanches (environ 15 colonies sur une boîte de pétri)

Divers contrôles ont été menés en prévision d'un éventuel échec des manipulations:

- *de compétence de cellules.* Il s'agit de transformer des XL1-Blue avec le plasmide non restreint.
- *de viabilité.* Des bactéries non transformées, subissant le même traitement, sont étalées sur des boîtes de LB seul.
- *de résistance à l'ampicilline.* Des bactéries non transformées sont étalées sur milieu LB + ampicilline.
- *de ligation.* Ce témoin consiste à étaler sur LB + ampicilline des bactéries transformées avec le plasmide reliqué. On peut également réaliser un contrôle avec des bactéries transformées avec le plasmide restreint.

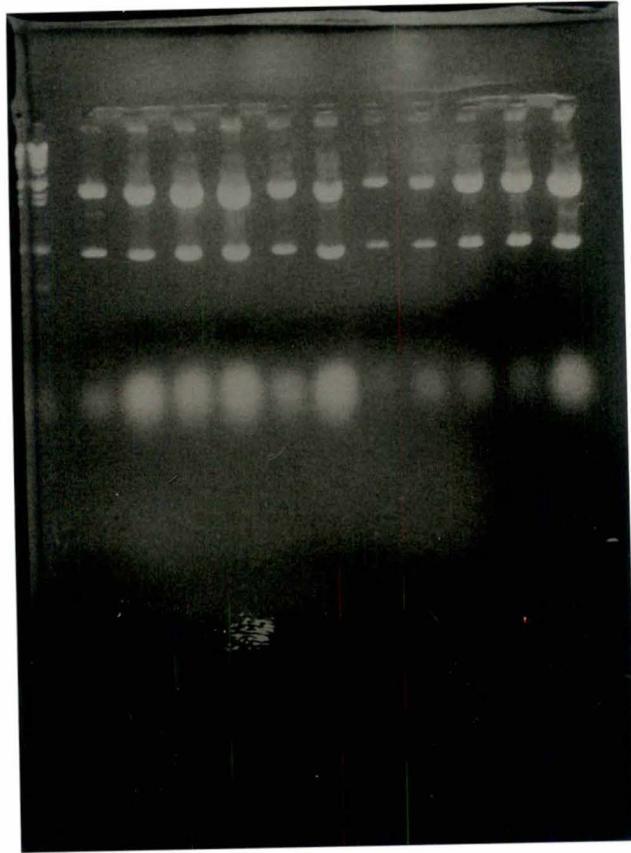


Figure 5.2 : L'ADN plasmidique de douze colonies blanches a été préparé puis restreint en *EcoRI*. Quelques microlitres du mélange de restriction ont été déposés sur un gel d'agarose afin de visualiser les fragments.

23.130 kb
9.416 kb
6.557 kb
4.361 kb

2.322 kb
2.027 kb

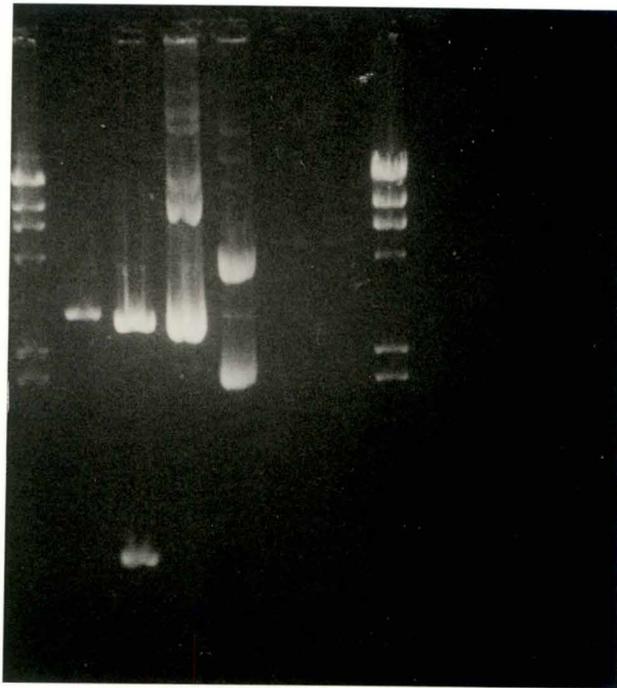


Figure 5.3 : 1^{ère} et 6^{ème} pistes: étalon de poids moléculaire.
2^{ème} piste: plasmide Bluescript restreint en *EcoRI*.
3^{ème} piste: Plasmide Bluescript recombinant (contenant l'insert du phage immunopositif) restreint en *EcoRI*.
4^{ème} piste: plasmide Bluescript recombinant, fermé.
5^{ème} piste: plasmide Bluescript non recombinant.
Notons la migration plus lente du plasmide recombinant (plus lourd).

Les bactéries du contrôle de viabilité se développèrent normalement. Il en fut de même pour le contrôle de compétence. Aucune colonie ne fut observée sur la boîte du contrôle de résistance à l'ampicilline. Pour ce qui concerne le contrôle de ligation, pratiquement autant de colonies se développèrent que lors du contrôle de compétence.

Certaines colonies furent étalées (avec un cure-dent) sur boîte de pétri contenant ampicilline, IPTG et X-Gal afin de vérifier leur couleur. Toutes ne se développèrent cependant plus une fois transplantées en milieu liquide + ampicilline. Ces bactéries n'étaient plus résistantes à l'ampicilline car elles provenaient en fait de colonies satellites : colonies isolées, mais situées dans le voisinage de colonies beaucoup plus denses. Les colonies très denses sécrètent de grandes quantités de β -lactamase, enzyme dégradant l'ampicilline. Cette enzyme diffuse dans le milieu et certaines bactéries ayant perdu leur plasmide supplantent les autres cellules de la colonie puisque libérées de cette charge énergétique que représente le plasmide. De plus, lorsque des colonies bleues sont repiquées de manière trop dense, des colonies blanches apparaissent parmi les bleues.

Douze colonies blanches ont été récupérées et amplifiées par culture en milieu liquide (5 à 10 ml). L'ADN plasmidique a été extrait par miniprep. des bactéries (plusieurs microgrammes par culture). Un échantillon de l'ADN récupéré fut restreint par *EcoRI* afin de vérifier par électrophorèse la présence d'un insert dans les plasmides. Dans tous les cas, un fragment fut visible aux environs de 700 paires de bases. Les plasmides préparés contenaient donc tous l'insert isolé à partir du phage λ gt11 immunopositif.

La photo ci-contre présente le résultat de la restriction de l'ADN des douzes colonies blanches récupérées (un échantillon a été déposé dans le même puits que l'étalon), (figure 5.2).

La figure 5.3 montre la différence de poids moléculaire entre un plasmide Bluescript natif et recombinant. Deux bandes correspondent au plasmide fermé: une forme superenroulée, qui migre plus vite que la forme circulaire ouverte (le plasmide restreint (ou forme linéaire) migre à une distance intermédiaire).

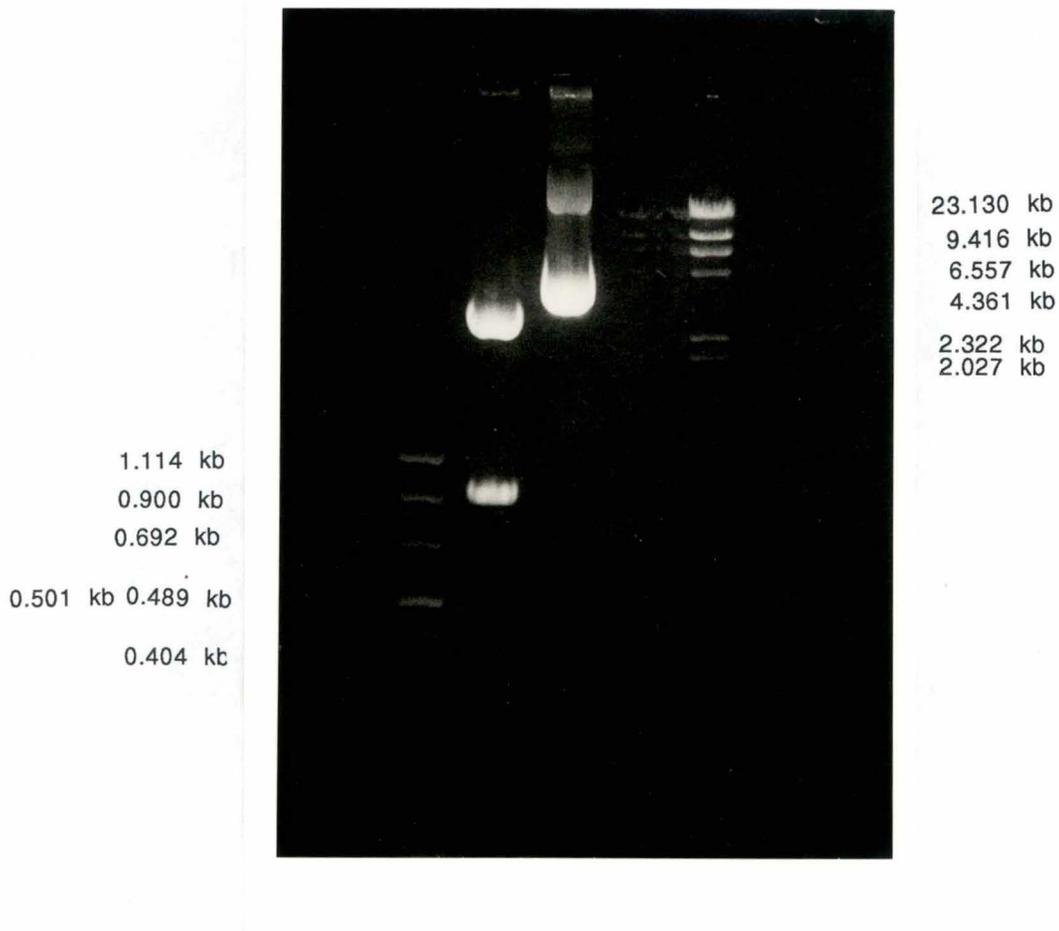


Figure 6.1 : Midipréparation d'ADN plasmidique et passage de ce dernier sur colonne Quiagen;
 Quelques microlitres de plasmides restreints *EcoRI* et fermés ont été déposés respectivement dans les puits (2) et (3).
 Les pistes (1) et (2) contiennent des étalons de poids moléculaire.

6. Préparation de l'ADN plasmidique bactérien en vue du séquençage de l'insert

Une des douze minipréparation d'ADN plasmidique servit à inoculer 100 ml de milieu de culture. Après une nuit à 37°C, les bactéries furent centrifugées et leur ADN plasmidique préparé selon le protocole d'une miniprep. à plus grande échelle. L'extrait plasmidique fut élué sur une colonne échangeuse d'anions (Quiagen) en vue d'obtenir des plasmides très purs pour le séquençage selon la méthode de Sanger. L'ADN plasmidique à disposition pour le séquençage fut de 150 µg après passage sur la colonne.

Ci-contre (figure 6.1), une photo de l'ADN purifié sur la colonne. La restriction des plasmides préparés permet de distinguer l'insert de 700kb (la taille évaluée sur ce gel semble supérieure suite à l'abondance de matériel)

7. Séquençage

Les amorces universelle "Reverse primer" et "T7 primer" ont été employées en vue du séquençage de l'insert dans les deux sens. Ces amorces sont en effet complémentaires de séquences bordant le cDNA cloné dans le site multiple de clonage du plasmide Bluescript.

La photo ci-contre (figure 7) représente l'autoradiographie du gel de séquence. Les figures 7.1 et 7.2 présentent les séquences lues à partir de l'amorce T7, respectivement pour un run de 2 et 4 heures, les figures 7.3 et 7.4 présentent les séquences lues à partir de l'amorce Reverse, respectivement pour un run de 2 et 4 heures.

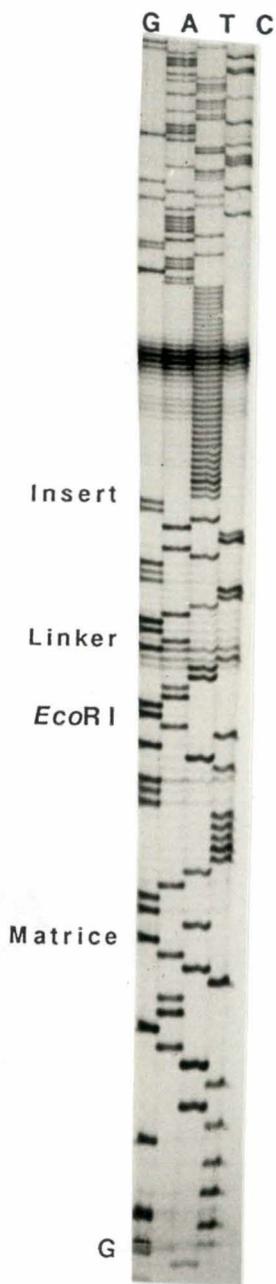


Figure 7.1

C = C Fig.7.2



Figure 7.2

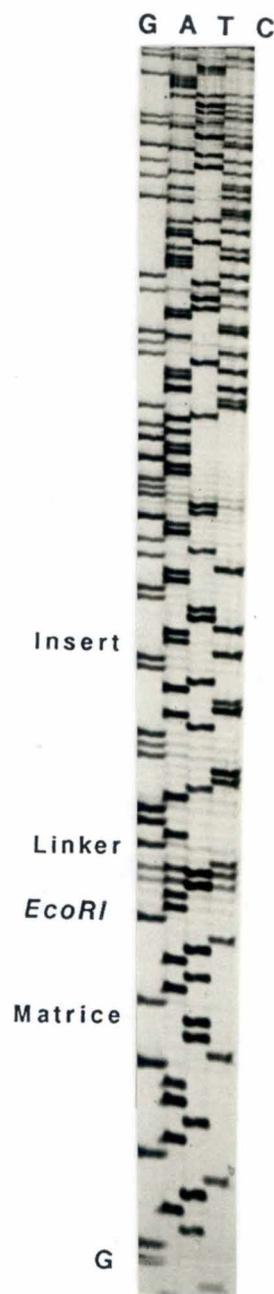


Figure 7.3

C = C Fig.7.4

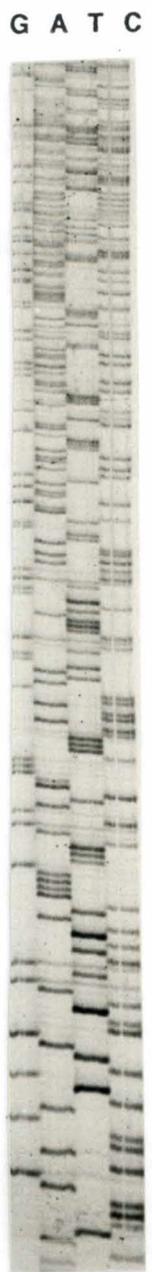
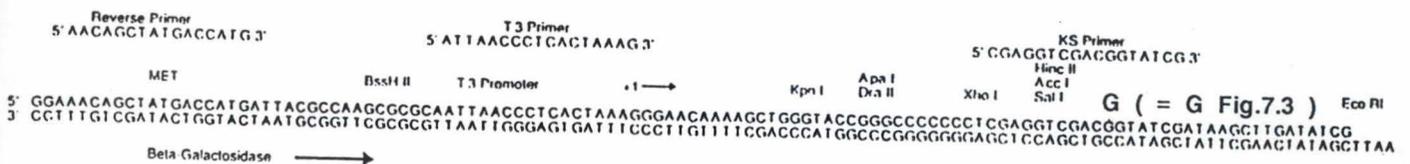
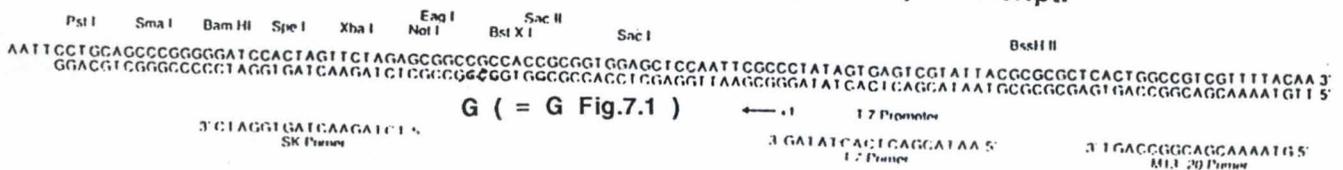


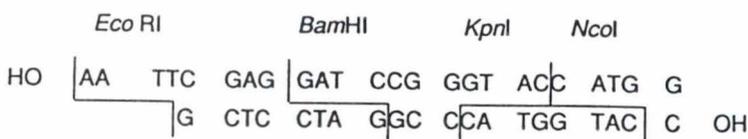
Figure 7.4



Site multiple de clonage du phagemide pBluescript.



G (= G Fig.7.1)



Amino acid - Phe. Glu. Asp. Pro. Gly. Thr. Met
 Sequence

Adaptor oligonucleotides designed for use with λgt11

7.1. A partir de l'amorce T7

Les 36 premières bases lues à partir du primer T7 correspondent à des nucléotides situés dans le site multiple de clonage du plasmide, précisément 28 bases en aval (sens de la polymérisation de l'ADN à partir de l'amorce T7) de la séquence complémentaire T7 de la matrice (voir figure 7.1).

Les 6 bases suivantes représentent le site *EcoRI*. Le cDNA synthétisé lors de la construction de la banque ne possédait évidemment pas de séquence *EcoRI* permettant de l'insérer dans le site unique *EcoRI* du phage λ gt11. Le cDNA fut alors muni de "linkers" à ses extrémités, des bouts cohésifs possédant à leur extrémité un site *EcoRI* clivé.

A la suite de ce site de restriction, il est possible de lire la séquence du linker (une dizaine de nucléotides fusionnés au site *EcoRI*). La polymérase semble avoir quelque peu dérapé lorsqu'elle est arrivée à la première base du linker (un G).

La dernière base du linker est suivie de la séquence de l'insert. Près de 35 T sont visibles au tout début de l'insert. Il s'agit en fait de la queue de poly-A recopiée en poly-T lors de la synthèse du cDNA. La présence de la queue de poly-A de ce côté de l'insert montre que l'ORF du cDNA (sens 5' - 3') se trouve dans le même sens que celle de la β -galactosidase. Environ 150 nucléotides de la séquence de l'insert peuvent être lus.

7.2. A partir de l'amorce Reverse

La séquence obtenue grâce à l'utilisation de l'amorce "Reverse primer" commence 73 bases en aval de cette dernière.

The best scores are:

init1 initn opt,,

Gb_Pl:Tobanper	M74103	Nicotiana sylvestris anionic perox,,,	230	230	302
Gb_Pl:Arcpnc1	M37636	A, hypogaea cationic peroxidase mRNA,,,	137	197	386
Gb_Pl:Tapero	X56011	Wheat mRNA for peroxidase 12/92	185	185	274
Gb_Pl:Lppod	X51764	Lupinus polyphyllus mRNA for peroxida,,,	167	167	210
Gb_Pl:Arneupero	X57564	A, rusticana mRNA for neutral pero,,,	132	165	217
Gb_Pl:Cuspreper	M91373	Cucumis sativus peroxidase mRNA, ,,,	154	154	217
Gb_In:Celr05d3	/rev L07144	C, elegans cosmid K05D3, 11/92	75	136	83
Gb_Pl:Pophpox14	D13683	P. kitakamiensis gene for peroxida,,,	102	130	112
Gb_Pl:Virprx	D11337	V, angulari mRNA for peroxidase basi,,,	92	129	144
Gb_Om:Sspmc1b	X53456	Pig mRNA for the plasma membrane C,,,	84	124	93
Gb_Vi:Hsecomgen	/rev M86664	Equine herpesvirus 1 complet,,,	64	121	64
Gb_Ba:Ecouw85u	/rev M87049	E, coli, genomic sequence of ,,,	59	118	67
Gb_In:Cezc84	Z19157	Caenorhabditis elegans cosmid ZC84 1,,,	54	118	55
Gb_Vi:Hsgend	X64346	Herpesvirus saimiri complete genome ,,,	56	117	60
Gb_Pl:Hvperoxi	X58396	Barley mRNA for peroxidase (EC=1,1,,,	107	107	232
Gb_Pl:Peaapxia	M93051	Pisum sativum ascorbate peroxidase,,,	94	94	94
Gb_Pl:Psapxi	X62077	P, sativum ApXI mRNA for ascorbate pe,,,	98	98	98
Gb_Pl:Taputper	X16081	Triticicum aestivum pathogen induc,,,	100	100	150

The best scores are:

init1 initn opt

Sw:Perx_Brara	P00434	brassica rapa (turnip), peroxidase ,,,	263	263	266
Sw:Per1_Arahy	P22195	arachis hypogaea (peanut), cationic,,,	249	249	252
Sw:Perx_Tobac	P11965	nicotiana tabacum (common tobacco),,,,	164	164	202
Sw:Per1_Horvu	P27337	hordeum vulgare (barley), peroxidase,,,	125	146	196
Sw:Per2_Lyces	P15004	lycopersicon esculentum (tomato), s,,,	140	140	150
Sw:Perx_Soltu	P12437	solanum tuberosum (potato), suberiz,,,	135	135	142
Sw:Per2_Cucsa	P19135	cucumis sativus (cucumber), peroxid,,,	131	131	165
Sw:Per1_Lyces	P15003	lycopersicon esculentum (tomato), s,,,	130	130	141
Sw:Per3_Armru	P17180	armoracia rusticana (horseradish), ,,,	76	121	158
Sw:Perc_Armru	P15233	armoracia rusticana (horseradish), ,,,	74	120	160
Sw:Perx_Luppo	P16147	lupinus polyphyllus (large-leaved l,,,	119	119	160
Sw:Pera_Armru	P00433	armoracia rusticana (horseradish), ,,,	70	116	157
Sw:Perc_Arath	P24101	arabidopsis thaliana (mouse-ear cre,,,	68	115	155
Sw:Perb_Armru	P15232	armoracia rusticana (horseradish), ,,,	68	114	153
Sw:Per2_Armru	P17179	armoracia rusticana (horseradish), ,,,	67	113	150
Sw:Pere_Arath	P24102	arabidopsis thaliana (mouse-ear cre,,,	66	111	148
Sw:Per2_Arahy	P22196	arachis hypogaea (peanut), cationic,,,	95	95	157
Sw:Vor1_Wcmvm	P09498	white clover mosaic virus (strain m,,,	38	58	41
Sw:Khyb_Ecoli	P00557	escherichia coli, hygromycin-b kina,,,	57	57	60
Sw:Vor1_Wcmvo	P15402	white clover mosaic virus (strain o,,,	38	57	41
Sw:Bem1_Yeast	P29366	saccharomyces cerevisiae (baker's y,,,	54	54	55
Sw:Tipa_Phavu	P23958	phaseolus vulgaris (kidney bean) (f,,,	53	53	56
Sw:Rpb1_Yeast	P04050	saccharomyces cerevisiae (baker's y,,,	40	52	43
Sw:Vp3_Ehdv1	P27281	epizootic hemorrhagic disease virus ,,,	40	52	40

Résultat de la comparaison entre l'ORF de la séquence clonée et des séquences présentes dans les banques EMBL et GeneBank (en haut) ainsi que SwissProt (en bas).

A cet endroit, les 23 bases précédant le site *EcoRI* du plasmide Bluescript (nucléotides de la matrice) peuvent être lues sur le gel de séquence (figures 7.3).

Le site *EcoRI* est suivi de la même séquence linker que celle lue à partir du primer T7.

La dernière base du linker est suivie de la séquence de l'insert. Plus de 200 bases, correspondant à une région située en amont du cDNA ont été séquencées dans ce sens.

7.3. Situation de l'ORF de l'insert (séquence lue à partir du primer Reverse) par rapport à la β -galactosidase

Sachant que l'insert était cloné dans le même sens que la β -galactosidase, il n'y eu que trois phases de lectures à examiner. Seule une s'avéra dépourvue de codons stop : il s'agit de la phase ouverte de lecture du cDNA cloné. En suivant l'ORF de la β galactosidase au travers du site multiple de clonage, dans le linker puis finalement dans l'insert, on remarque que les phases ouvertes de lecture ne sont pas en fusion. Il ne peut donc pas y avoir expression de la protéine de fusion à partir de ce plasmide Bluescript recombinant.

7.4. Nature de la protéine codée par le cDNA cloné

Les 200 nucléotides de la phase ouverte de lecture furent comparés aux séquences connues et répertoriées dans les banques Genebank 75.0 (02/93) et EMBL 33.0 (12/92); la séquence lue à partir de l'amorce T7 ne se trouve pas dans l'ORF. Les douzes séquences présentant le pourcentage d'identité le plus élevé avec

Gb_Pl:Arcpnc1

LOCUS ARCPNC1 1116 bp ss-mRNA PLN 04-JAN-1993
DEFINITION A,hypogaea cationic peroxidase mRNA, complete cds, clone prxPNC1,
ACCESSION M37636
KEYWORDS cationic peroxidase,
SOURCE A,hypogaea, cDNA to mRNA,
ORGANISM Arachis hypogaea , , ,

SCORES Init1: 137 Initn: 197 Opt: 386
66,7% identity in 237 bp overlap

Genema GAGGATCCGGGTACCATGGCAACTTGGAACGTGAAGTTGGGAAGAAGA
Arcpnc GCTAGAGACTCTGTTGTTGCTCTAGGAGGAGCAAGTTGGAATGTGTTATTGGGAAGAAGA
Genema GATGCCACAACACTGCGAGCCAATCTGCTGCAAACACTAACATCCCAGCACCCGACTGCTAGC
Arcpnc GACTCAACCACTGCAAGTTTAAGCTCTGCTAACTCAGATTTGCCGGCTCCATTTTTTAAT
Genema CTCAGTGCTCTCATCAAAAGTTTCAGCGATCAAGGGCTTCCACCACCGATATGGTCGCT
Arcpnc CTTAGTGGCCTTATCTCTGCTTTCTCCAACAAAGTTTCACAACAAAAGAACTCGTTACT
Genema TTATCTGGTGCGCACACCATTGGTCAAGCAAGATGCACAACATTTAGAACTCGCATTTAC
Arcpnc CTATCAGGAGCGCATAACAATTGGGCAAGCACAAATGCACAGCCTTCAGAACAAGGATTTAC
Genema AACGAGAGCAACATTGA-CCATCATTT
Arcpnc AATGAGAGCAACATAGATCCAACATATGCAAAATCATTGCAAGCAAATTGTCCTAGCGTA

Genema EDPGTMATWNVKLGRRDATASQSAANTNIPAPTAS
Per1_A SQVESLCPGVVSCADILAVAARDSVVALGGASWNVLLGRRDSTTASLSSANSDLPPFFN
Genema LSALIKSFSQDQLSTTDMVALSGAHTIGQARCTTFRTRIYNESNIDHH
Per1_A LSGLISAFSNKGFTTKELVTLGSAHTIGQAQCTAFRTRIYNESNIDPTYAKSLQANCPV
Per1_A GGD TNLSPFDVTT PNKFDNAYYINLRNKKGLLHSDQQLFNGVSTDSQVTAYSNNAATFNT

Comparaison de la séquence clonée avec un messenger de peroxydase cationique
d'Arachis hypogea (messenger présentant le plus grand pourcentage d'identité avec la
séquence clonée).
En dessous, comparaison des mêmes séquences traduites en acides aminés.

le cDNA cloné sont toutes, sauf une, reconnues comme des ARN messagers codant pour une peroxydase de plante.

Une de ces douzes séquence représente celle d'un ARN messenger dont la transcription est induite chez le froment suite à l'attaque de la plante par un pathogène. Les peroxydases sont connues pour voir leur synthèse induite en cas de stress tel une attaque d'un pathogène !

Après ces 12 ARN messagers, plus aucune peroxydase ne figure parmi les séquences comparées.

La comparaison fut également réalisée à partir de la séquence en acides aminés de la phase ouverte de lecture de l'insert (toujours grâce au primer Reverse). Cette fois, les 17 protéines de la banque SwissProt 24 (01/93) dont la séquence en acides aminés est la plus proche de celle clonée représentent toutes des peroxydases de plantes.

Tout semble indiquer que la protéine abondante isolée du tissu compact est donc une peroxydase.

DISCUSSION

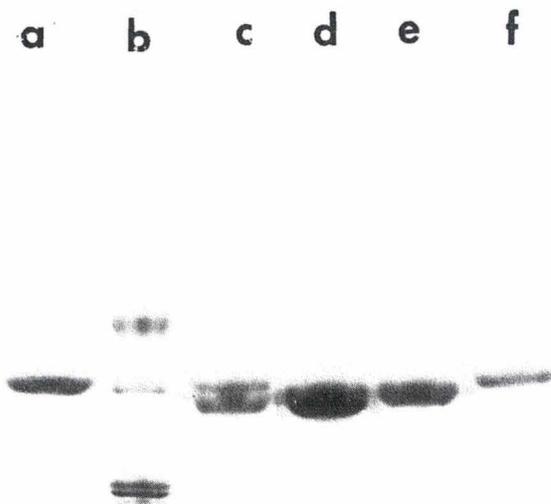


FIG. 1. Determination of mol wt of anionic and cationic peroxidase from peanut cells. Electrophoresis was carried out on a 5 to 17.5% gradient slab gel. Two concentrations for anionic (a, 20 μ g and f, 10 μ g) and for cationic (d, 40 μ g and e, 25 μ g) and 15 μ g each for the combined sample (c) were used. Channel b carries marker proteins (serum albumin 67 kD; ovalbumin 43 kD; soybean trypsin inhibitor 20 kD and Cyt (12.5 kD). Following electrophoresis the gel was stained with Coomassie blue.

DISCUSSION

Examen de la peroxydase clonée

Les peroxydases sont étudiées depuis longtemps en biologie végétale, entre autres grâce à l'existence de systèmes de détection de ces enzymes mis au point pour les cellules animales. On s'est vite rendu compte que diverses isoenzymes étaient exprimées chez les végétaux. Il s'agit de peroxydases différant dans leur poids moléculaire, leur charge et parfois la nature de leur substrat. La charge est un moyen de classer les peroxydases en anioniques (chargées négativement) et cationiques (chargées positivement), les enzymes migrant dans un gel d'électrophorèse natif en direction de la cathode (charge positive) ou de l'anode (charge négative). Leur présence est ensuite révélée en immergeant le gel dans une solution où un substrat est oxydé et forme un précipité coloré sous l'action des peroxydases.

Les différences d'activité catalytique des peroxydases cationiques et anioniques ont été investiguées chez *Arachis hypogea* (la cacahouète) par Ravondra et al. (1984). Par chromatographie d'échange d'ions et ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium, ces auteurs sont parvenus à purifier séparément deux isoenzymes. Ils en ont conclu que les deux peroxydases étudiées pouvaient utiliser les mêmes substrats avec une efficacité pratiquement identique. C'est le cas avec l'eugénol, considéré comme un substrat naturel pour détecter la capacité de synthèse de lignine.

Ces enzymes ont été également séparées sur gel dénaturant et colorées à l'argent. Les profils obtenus lorsque les deux formes de peroxydases sont déposées sur la même piste (voir ci-contre) montrent une similitude (du point de vue des différences de poids

moléculaire) avec les deux bandes intenses observées à 32kDa sur l'électrophorèse d'extraits de parois cellulaires de tissu compact.

En effet, même colorées au bleu de coomassie, les deux bandes les mieux visibles présentent un profil qui ressemble à celui publié par Ravondra et al. Dans notre cas, rappelons que c'est la bande inférieure (électroéluée) qui a permis le criblage de la banque de cals compacts.

Cette isoenzyme correspondrait à la plus légère des deux formes examinées par Ravondra et al. (1984). Les deux peroxydases d'*Arachis hypogea* diffèrent cependant par leurs sites sensibles à la trypsine et ne sont pas liées immunologiquement.

Si les deux bandes observées dans l'extrait compact de betterave représentent bien deux isoenzymes de peroxydase, la reconnaissance de ces deux protéines par le polysérum dirigé contre la plus légère pose certaines questions.

Soit, comme c'est le cas pour la cacahuète, les deux enzymes sont immunologiquement distinctes et le polysérum a été dirigé contre les deux isoenzymes (contamination d'une bande à l'autre lors du découpage de la bande choisie), soit ces deux isoenzymes possèdent des épitopes communs et sont donc normalement reconnus lors du Western blot.

Par ailleurs, les deux peroxydases d'*Arachis hypogea* se sont avérées avoir des poids moléculaires nettement supérieurs à ceux des éventuelles isoenzymes du cal compact de betterave : 40 et 42kDa pour la forme anionique, taille estimée par les auteurs sur électrophorèse SDS-PAGE. Notons à ce propos que Van Huystee et al. (1992) ont observé diverses tailles d'oligosaccharides liés aux peroxydases d'*Arachis hypogea*.

En fait, bien plus que l'éventuelle similitude de profils électrophorétiques entre les deux peroxydases de cacahouète et la zone de 32kDa observée sur l'extrait de paroi du tissu normal, un argument bien plus déterminant est que la peroxydase clonée

partage une séquence très similaire avec celle de la forme cationique d'*Arachis hypogea*. Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques comparées dans les banques EMBL et Genbank, celle de la peroxydase cationique d'*Arachis hypogea* présente le plus de similitude avec le cDNA cloné si on optimise l'alignement (en se permettant de réaliser une coupure dans une des séquences). Le messageur tiré de la banque comporte 1116 nucléotides dont 945 environ codent pour une séquence protéique.

La comparaison entre la séquence clonée traduite en acides aminés et les nombreuses séquences répertoriées dans la banque de protéines SwissProt permet bien sûr aussi la mise en évidence d'une nette ressemblance avec celle de la même peroxydase cationique d'*Arachis hypogea* (la peroxydase trouvée dans la banque comprend 316 acides aminés). Celle-ci vient en deuxième position dans l'ordre de ressemblance parmi les 17 peroxydases de plantes trouvées dans la banque.

La comparaison entre les deux séquences nucléotidiques commence à la 424 ième base du messageur de la peroxydase cationique d'*Arachis hypogea*. Considérant que les protéines sont très voisines, on peut se demander si l'insert que nous avons cloné n'est pas amputé de plus de 400 paires de bases. La taille de l'insert, évaluée à 700 paires de bases, représente 400 paires de bases en moins que le messageur total d'*Arachis hypogea*.

Rôle des peroxydases dans la physiologie des cals

L'action des peroxydases sur la physiologie des cals n'est pas encore clairement comprise : les données qui s'accumulent ne représentent jamais que des observations réalisées dans des contextes très limités.

Un domaine particulièrement étudié est celui de la dégradation de l'acide indole-acétique. Il est bien connu que l'AIA subit un transport polarisé des organes producteurs, les apex et les tissus méristématiques, vers les racines via non pas les vaisseaux conducteurs, mais via des cellules parenchymateuses en contact avec les faisceaux vasculaires. Ce transport polarisé fait appel à un mécanisme chémiosmotique et implique le transport de l'hormone de cellule en cellule via l'apoplasme, c'est-à-dire les parois cellulaires.

Dans l'apoplasme, l'AIA peut être oxydé pour former du 3-méthylène oxindole avec dégagement de CO₂. L'enzyme qui catalyse cette réaction est l'AIA oxydase. Plusieurs isoenzymes de l'AIA oxydase existent, et elles sont toutes ou presque toutes identiques aux peroxydases impliquées dans les étapes précoces de formation de la lignine.

Ainsi, une étude réalisée sur le hêtre et le raifort, par exemple, a permis de détecter vingt isoenzymes de peroxydases, et toutes avaient une activité AIA-oxydase. Les auxines de synthèse et les auxines conjuguées ne sont pas dégradées par ces oxydases, et persistent donc beaucoup plus longtemps dans le végétal.

L'activité AIA-oxydase des peroxydases pourrait diminuer le taux d'auxines endogènes, nécessitant ainsi un apport exogène de cette hormone (Kevers et al.1981). On sait par ailleurs que (1) l'activité de l'AIA-oxydase augmente avec l'âge des tissus, (2) il y a une corrélation négative entre taux de croissance et contenu en AIA-oxydase de différents organes et (3) les tissus racinaires contiennent de très faibles concentrations en AIA et de très fortes activités d'AIA-oxydases.

Toutefois, le dosage de l'acide indole acétique endogène ne montre pas de différence entre les cals normaux et habitués. On ne peut dès lors considérer que le 2,4-D ajouté dans le milieu de culture compense le déficit en auxine endogène.

Des effets du 2,4-D sur l'activité peroxydasique ont toutefois permis d'élaborer une autre hypothèse : le 2,4-D aurait *in fine* une activité inhibitrice de l'action des peroxydases sur l'oxydation de l'AIA. Kevers et al.(1981) ont montré que les tissus normaux contenaient des taux plus élevés en inhibiteurs de peroxydase et en agent protecteur de l'acide indole acétique. L'hypothèse serait dès lors que le 2,4-D aurait un effet protecteur sur l'AIA via des substances inhibitrices des peroxydases.

Cette hypothèse a reçu un début de confirmation. L'évaluation de l'effet inhibiteur d'un extrait sur l'activité peroxydasique se fait en mesurant l'activité d'une peroxydase, généralement la peroxydase de raifort, sur le guaiacol en présence d'un broyat cellulaire. Le spectre d'absorption du guaiacol est modifié après peroxydation et l'activité enzymatique peut être évaluée par une mesure d'absorbance au spectrophotomètre. L'effet d'un type de tissu sur l'oxydation de l'AIA est évalué en dosant l'auxine en présence ou en absence d'un broyat cellulaire de l'un des deux types de cal.

Notons que d'autres hormones peuvent interférer sur la relation auxines-peroxydases : on sait depuis longtemps que les gibberellines peuvent moduler les niveaux d'auxine via des protecteurs d'auxines (Galston et Warburg, 1959, Gaspar et Bouillenne-Walrand, 1966) et/ou directement via des peroxydases agissant sur l'AIA. Des cals normaux et habitués de betterave ont été cultivés respectivement en absence et en présence de 2,4-D (Gaspar et al, 1988). On ne détecte pas de modification importante des peroxydases, mais dans la souche normale privée de 2,4-D, la protection de l'auxine diminue de même que les taux d'AIA endogènes. Dans les cals habitués, lors de l'apport de 2,4-D, l'inhibition des AIA oxydases augmente, quoique les taux endogènes d'auxine ne varient pas.

Comme les quantités de peroxydases présentes dans chaque souche ne différaient pas, ces auteurs postulèrent l'existence de substances puissamment inhibitrices de l'activité peroxydasique. Ces substances (des molécules de type phénolique) seraient

fermement liées aux peroxydases et migreraient en association avec les isoenzymes durant l'électrophorèse native, ce qui a d'ailleurs été observé chez *Cichorium* (Legrand et al., 1976).

Toutefois, les résultats obtenus au cours de ce travail montrent une abondance supérieure d'au moins une peroxydase dans les parois de calcs normaux par rapport aux calcs habitués de betterave. La plus grande abondance de cette peroxydase liée ioniquement aux parois cellulaires des calcs compacts est concomitante à l'intense lignification qui caractérise les parois cellulaires de ces tissus.

L'intervention des peroxydases dans le processus de lignification est à l'heure actuelle clairement établi. La peroxydase joue un rôle dans l'élaboration de la paroi secondaire végétale en attaquant le groupe *para*-hydroxyle des précurseurs de lignine sécrétés dans la matrice pariétale. Par déshydrogénation, des radicaux libres sont formés, qui vont amorcer une cascade de réactions, sans intervention enzymatique. Dans ce contexte, la déficience en lignine caractérisant les cellules habituées n'a évidemment pas manqué d'être corrélée à la très faible activité peroxydasique observée dans la souche habituée.

L'habitué, une des dernières étapes vers la cancérisation du matériel végétal ?

Les calcs végétaux, en l'occurrence les calcs normaux primaires (premiers calcs du protocole d'obtention des calcs habitués non organogènes) pourraient être considérés comme des néoformations tératologiques entrant dans un processus menant finalement à un véritable cancer végétal, à savoir le calc habitué non organogène (Gaspar et al. 1991).

Les cellules des cals normaux sont toujours plus riches en peroxydases que les tissus desquels elles proviennent. Une telle augmentation de l'activité peroxydasique a souvent été interprétée comme résultant du stress dû à l'excision du tissu et à la nature du milieu de culture *in vitro*. Les cals secondaires se développant après traitement au froid des cals primaires, manifestent une activité peroxydasique progressivement plus faible. Cette diminution est corrélée avec une diminution de la capacité organogène des tissus. Les cellules de cals habitués, à la fin de leur progression néoplasique (cals non organogènes) sont caractérisés par une activité particulièrement faible en peroxydase ainsi qu'une sécrétion moindre de ces enzymes dans la paroi.

Une faible activité en peroxydase semble être une caractéristique générale de lignées de cellules végétales habituées car d'autres cals habitués présentent une telle similitude. Cette faible activité peroxydasique des cals pleinement habitués et non organogènes a été reliée non seulement à leur incapacité à synthétiser la lignine et à se différencier en cellules xylémiennes (paroi secondaire), mais également à leur déficience dans l'élaboration de la paroi primaire.

Notons incidemment que les tumeurs animales se développant en absence d'hormone montreraient également des taux de peroxydases plus bas que celles dépendantes d'hormones. Certains auteurs vont jusqu'à établir des analogies entre des cellules végétales habituées et des cellules cancéreuses animales (Gaspar et al.1991). Les cellules habituées montrent de l'aneuploidie et cette caractéristique est largement acceptée comme étant un signe de tumorigénèse. Elles sont souvent polyploïdes et près de 66% d'entre elles possèdent au moins 5 copies du génome. Les noyaux de cellules habituées ont une forme très irrégulière et sont souvent hypertrophiés (rapport noyau/cytoplasme élevé) et leurs nucléoles présentent des caractéristiques ultrastructurales voisines de ce qui s'observe dans les cellules cancéreuses (contour diffus, nombre anormal).

La présence abondante d'enzymes telles que ascorbate peroxydase, glutathione réductase et autres enzymes capteurs de radicaux oxygénés pourrait être une manifestation d'un effet antioxydant puissant des cals habitués. Ceci d'autant plus que les groupements porphyriques, connus pour être à l'origine de radicaux libres sous l'action de la lumière, sont nettement moins abondants dans ce type de cal. Toujours selon ces auteurs, Les cellules habituées pourraient être considérées comme privées de vieillissement, ce qui s'exprimerait par une croissance néoplasique (tumeur).

Habitude et vitrification.

En culture in vitro, on obtient parfois des explants ayant un phénotype fort semblable à celui des cals habitués. Ces tissus hyperhydriques sont appelés vitrifiés (Gaspar et al. 1991). Les événements à l'origine de ce phénomène ne sont pas précisément connus, mais on est d'avis qu'un stress chimique ou physique est responsable de ces changements physiologiques.

L'activité des peroxydases de ces plantes a été mesurée et les résultats ont montré une nette déficience de ces tissus. D'autres similitudes entre vitrification et habitude peuvent être énumérées, telles qu'une paroi cellulaire déficiente (dont le contenu en lignine est très faible, voire inexistant), une absence de centres méristématiques, un taux d'éthylène émis particulièrement bas, etc...

Certains tératomes végétaux induits par des bactéries présentent de nettes ressemblances avec des tissus vitrifiés. On en arrive ainsi à l'hypothèse que la vitrification représenterait peut-être un pas vers la cancérisation du matériel végétal.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail consistait à comparer les protéines pariétales de calcs compacts (normaux) et friables (habitués) de betteraves, et de tenter de cloner la séquence codant pour une protéine spécifique d'un type de cal.

Nous avons d'abord mis au point un protocole reproductible d'extraction de ces protéines. L'infiltration sous vide des tissus dans des solutions salines, suivie d'une centrifugation à basse vitesse a permis l'isolement des protéines liées ioniquement aux parois cellulaires, sans aucun effet négatif sur la viabilité des cellules elles-mêmes.

Une électrophorèse dénaturante réalisée à partir des extraits pariétaux des deux souches de calcs a mis en évidence, par coloration à l'argent, de nettes différences quant aux profils protéiques obtenus.

L'extrait pariétal d'un type de cal a été révélé au cours d'un western blot avec deux antisérums dirigés chacun contre la totalité des protéines des parois de chaque souche, compacte et friable. Ce test immunologique n'a pas permis la détection de protéines définitivement absentes dans une souche.

Il a fallu dès lors se concentrer sur une protéine particulièrement abondante dans un des tissus (le cal compact). La protéine choisie était celle qui se voyait le mieux par coloration au bleu de Coomassie, et était apparemment absente du cal friable.

Nous avons réalisé plusieurs électrophorèses préparatives dont nous avons découpé la bande choisie et nous en avons électroélué la protéine. L'efficacité de cet isolement a été vérifiée par électrophorèse de l'échantillon élué.

L'immunisation d'un lapin avec cette protéine a permis l'obtention d'un polysérum dirigé contre la protéine en question.

Le polysérum a été utilisé dans un western blot contre les extraits pariétaux des deux calcs.

Le polysérum reconnaissait bien la bande excisée du gel, mais également la bande de poids moléculaire juste inférieure à celle-ci.

Une banque de cDNA établie dans λ gt11 à partir des messagers totaux de calcs compacts a été criblée avec le polysérum, et un clone nettement positif a été détecté après criblage de 20.000 pages de lyse.

Les phages recombinants immunopositifs ont été isolés et amplifiés afin d'en obtenir suffisamment d'ADN. Cet ADN a été restreint pour en exciser l'insert et le cloner dans le plasmide Bluescript en vue du séquençage.

Les plasmides ayant intégré le cDNA ont été isolés via la transformation de bactéries XL1-Blue. L'ADN plasmidique des colonies blanches (bactéries transformées par le plasmide recombinant) a été restreint afin de vérifier la présence de l'insert originalement cloné dans les phages.

Une midipréparation de cet ADN plasmidique recombinant a permis l'obtention d'ADN en quantité suffisante pour le séquençage.

Près de 200 paires de bases ont été lues dans l'ORF et elles furent comparées aux nombreuses séquences répertoriées dans les banques de gènes (EMBL et GeneBank) et de protéines (SwissProt). Dans ces banques, les séquences présentant le plus grand pourcentage d'identité avec l'ORF séquencée représentaient plusieurs peroxydases de végétaux.

L'abondance de peroxydase dans le tissu compact corrobore des observations de la littérature sur l'activité peroxydasique plus intense dans la souche normale que dans la souche habituée.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

La contribution des peroxydases dans la physiologie des cals de betterave normaux ou habitués pourrait être abordée par les techniques de la biologie moléculaire.

Une surexpression de la peroxydase pourrait être induite en introduisant un promoteur fort en amont du gène dans la souche friable. Il y a de fortes chances qu'une telle manipulation s'accompagne de modifications phénotypiques découlant du rôle particulier des peroxydases dans les cals de betteraves.

A l'inverse, on peut envisager de recombinaison la souche normale avec une construction contenant un ARNm anti-sens correspondant à la peroxydase, sous contrôle d'un promoteur constitutif. Les ARN messagers complémentaires s'associeraient, ce qui se traduirait par une non-expression de l'enzyme.

L'importance de la peroxydase clonée dans les phénomènes de différenciation pariétale, de morphogenèse (via son action sur l'AIA) et éventuellement d'adhésion intercellulaire, pourrait donc être étudiée par la surexpression du gène correspondant dans des cals habitués ou par son inhibition par la technique des ARNm anti-sens chez les cals normaux.

Un gène rapporteur fréquemment utilisé en biologie moléculaire végétale est le gène de la b-glucuronidase (GUS). Ce gène est fusionné à la région promotrice/opératrice du gène dont on souhaite étudier l'expression. Un test, analogue au test blanc/bleu basé sur l'activité de la b-galactosidase, permet d'étudier l'expression de la protéine en fonction des paramètres de l'environnement et de la différenciation cellulaire. Lorsque le promoteur du gène est activé, la glucuronidase est synthétisée et l'enzyme métabolise un substrat, le X-Glu (5-Bromo, 4-Chloro, 3-Indolyl glucuronide), en un produit coloré (comme le X-gal).

L'obtention de cals au départ d'explants transformés par GUS sous contrôle du promoteur de la peroxydase permettrait d'étudier l'expression et le rôle de cette enzyme lors de la callogenèse elle-même, et plus particulièrement, lors de la perte de la capacité organogène de ces cals.

Mais l'objectif premier et l'intérêt de ce travail résident dans la mise au point d'une méthodologie, le criblage immunologique d'une banque d'expression, appliquée à deux phénotypes possédant le même génotype.

L'approche que nous avons suivie, c'est-à-dire l'excision d'une bande d'un gel préparatif d'électrophorèse, l'électro-élution de la protéine et son injection à un lapin en vue d'en obtenir un sérum spécifique pour le criblage immunologique de la banque d'expression, peut être appliquée à toutes les autres protéines majoritaires visibles sur les gels d'électrophorèse des deux types de cals.

Plus directement, on peut aussi cribler la banque avec des anticorps spécifiques, de protéines d'adhésion par exemple, obtenus et caractérisés sur des cellules animales ou humaines.

Finalement, sachant qu'on estime qu'il existe plusieurs centaines de protéines différentes dans la paroi cellulaire végétale, dont seulement quelques dizaines sont caractérisées, on pourrait envisager de cribler la banque d'expression avec les serums que nous avons obtenus contre les extraits protéiques bruts solubilisés de la paroi des cals. Le problème consisterait alors à séquencer la masse de clones qu'on retiendrait du criblage.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Bowles, D.J. (1990) Defense Related Proteins in higher Plants.- Annual Rev.Biochem.1990. 59:873-907.
- Cohen, E., S Arad, Y. H. Heimer, and Y Mizrahi (1984). : Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of chlorella. correlation between ornithine decarboxylase and DNA synthesis at different light intensities. Plant Physiol.74, 385-388
- Crèvecoeur, M., Kevers, C., Greppin, et Gaspar, Th. (1978). A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated Sugarbeet calli.-Biol. Plant. 29:1-6
- De Greef et Jacobs, M.(1979) In vitro culture of the sugar beet : Description of a cell line with high regeneration capacity.- Plant. Sci. Lett. 17:55-61
- Fry, S.C.(1986). Cross-linking of Matrix Plymers in the growing cell walls of angiosperms.-Annu. Rev.Plant.Physiol. 37:165-186.
- Gaspar, Th., Kevers, C., Penel, C., Crèvecoeur, M. et Greppin, H. (1988) Biochemical characterization of normal and habituated Sugarbeet calli. Resationship with anatomy habituation and organogenesis.- Potsdamer Forschung. B. 57:20-30
- Hagège, D., Kevers, C. and Gaspar, Th. (1991). A comparison between ethylene production, ACC and mACC contents, and hydroperoxide level in normal and habituated Sugarbeet calli. - Physiol. Plant. 82:397-400
- Hagège, D., Kevers, C., Boucaud, J., Duyme, M. and Gaspar, Th., (1990). Polyamine, Phospholipids and hydroperoxides in normal and habituated Sugarbeet Calli. - J.Plant.Physiol.136:641-645.

- Hagège, D., Kevers, C., Crèvecoeur, M., Tollier, M Th., Monties, B., Boucaud, J. et Gaspar, Th. (1991). Peroxydases, growth and differentiation of habituated Sugarbeet cells - *in* Molecular and physiological Aspects of Plant Peroxidases (J.Lobarszewski et al., eds). Univ of Genève, Switzerland (in Press).
- Kaur-Sawhney, R., Y. R. Dal, and A. W. Galston: Effect of inhibitors of polyamines biosynthesis on gibberellin - induced internode growth in light - grown dwarf peas. *Plant Cell , Physiol.* 27, 253-260 (1985)
- Lieberman, M., Wang, S.Y. and Owens, L.D.(1979). Ethylene produced by callus and suspension cells from cortex tissue of post climactéric apples.- *Plant Physiol.*63:811-815.
- Liners, F., Gaspar, Th., Van Cutsem, P. (1993) . Acetyl- and Methylesterification of pectins of friable and compact sugarbeet calli : consequences for intercellular adhesion. *Planta* (in press).
- Maniatis T., Fritsh E. F. and Sambrook J. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed.
- Phillips, R., M. C. Press, and A. Eason (1988).: Polyamines in relation to cell division and xylogenesis rather than cell division. *J. Exp. Bot.* 39, 473-480
- Ravindra, N., Chibbar and Robert B. van Huystee, R.B.(1984) Characterization of Peroxydase in Plant Cells. *Plant Physiol.* 75:956-958.
- Roberts, L.W., Gahan, P.B. and Aloni, R. (1988). Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators. Springer Verlag, Berlin p.154.ISBN 3-540-18989-0.
- Tabor, C.W.and H. Tabor (1984): Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53,749-790
- Van Huystee, R.B., Sesto P.A., O'Donnel J.P (1992) . Number and size of oligosacccharides linked to peanut peroxidases. *Plant Physiol Biochem* 30: 147-152.