



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'identification d'intermédiaires de la transduction du signal chez les végétaux supérieurs

Van Eetvelde, Carl

Award date:
1996

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

**CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION D'INTERMEDIARES DE LA
TRANSDUCTION DU SIGNAL CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par
VAN EETVELDE Carl
Août 1996**



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

Contribution à l'identification d'intermédiaires de la transduction du signal chez les végétaux supérieurs

VAN EETVELDE Carl

Résumé

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires et les kinases jouent des rôles importants dans la transduction du signal. Ces récepteurs permettent la transmission et l'amplification de l'information en provenance de l'extérieur vers l'intérieur des cellules. Quant aux kinases, elles interviennent également dans la transmission et la régulation des signaux perçus. En se basant sur les études réalisées au labo de génétique moléculaire de l'Hôpital Erasme de l'ULB, c'est-à-dire, la recherche de récepteurs à sept domaines transmembranaires chez les cellules humaines grâce à la technique de PCR, nous avons tenté de rechercher ces récepteurs chez les cellules végétales de *Nicotiana tabacum*. Nous avons appliqué la même méthode à la recherche de kinases. Nos expériences nous ont amené à amplifier une séquence codante pour une kinase homologue à une kinase nommée Atpk7 appartenant à *Arabidopsis thaliana*. En ce qui concerne l'amplification de séquences codantes pour un récepteur à sept domaines transmembranaires chez *Nicotiana tabacum*, les nombreuses PCR réalisées ne nous ont pas permis d'en détecter la présence.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Août 1996

Promoteur : P. VAN CUTSEM.

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

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide technique, leurs conseils et leurs encouragements dans les moments difficiles : Jean-Pierre, André, Sonia, Laurence, Pierre, Dominique. Je remercie également Johan.

Merci Flore, Luis et Isabelle G. pour le temps que nous avons passé ensemble. Je remercie tout particulièrement Natacha qui a su partager sa bonne humeur et son sourire.

Merci à toute ma famille sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Abréviations

2.4 D	Acide 2.4 dichlorophénoxyacétique
4CL	4-coumarate-CoA lyase
A	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire à de l'ARN
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
βARK1	β-adrenergic receptor kinase 1
C	Cytidine
Ca-CaM DPK	Protéine kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline
CaMK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CBP	Calmodulin Binding Peptide
CDK	Kinases dépendantes de la cycline
CDPK	Calcium dependent protein kinase
CHS	Chalcone synthase
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CKII	Casein kinase II
CRK	CDPK-related kinase
DAG	Diacylglycérol
DGK	Protéines kinases dépendantes du diacylglycérol
DO	Densité optique
DP	Degré de polymérisation
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
G	Guanosine
GAP	Ras GTPase-activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSK-3	Glycogen synthase kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HRGP	Hydroxyprolin rich glycoprotein
IPTG	Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside
LB	Milieu de Luria-Bertani
LRR _s	Leucin-rich repeats
MAP	Microtubule-associated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MS	Milieu de Murashige et Skoog
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NR	Nitrate réductase
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PCR	Polymerase chain reaction
PI-3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PI-4P	Phosphatidylinositol 4-monophosphate
PI-4K	Phosphatidylinositol 4 kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylsérine
RAPD	Random amplification polymorphic DNA
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G

Abréviations

RLK	Receptors-like kinases
SDS	Sodium dodécylsulfate
SLG _s	S locus glycoproteins
SRK _s	S locus receptor kinases
T	Thymidine
TE	Solution tris-EDTA
TNE	Solution tris-NaCl-EDTA
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13acetate
UV	Ultra-violet
V ₁	Vasopressine
V ₂	Vasopressine
X-Gal	5-Bromo 4-Chloro 3-indoyl, β -D galactopyranoside

	Page
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.	1
1. Les pectines : molécule-signal.	1
2. Les récepteurs à sept domaines membranaires ou récepteurs à protéines G.	3
2.1. Chez les cellules animales...	3
2.1.1. Structures primaire et secondaire des récepteurs à sept domaines membranaires.	3
2.1.2. Prédiction de la structure secondaire.	3
2.1.3. Structure tridimensionnelle des RCPG.	3
2.1.4. Les protéines G.	4
Mode d'action des protéines G.	5
2.1.5. Les enzymes et canaux ioniques qui interagissent avec les RCPG.	5
2.2. Chez les végétaux...	5
2.2.1. Indications de l'existence de RCPG.	5
Exemple 1 : récepteur à auxine.	6
Exemple 2 : récepteurs et flux de potassium.	6
Exemple 3 : récepteurs de β -glucanes fongiques.	6
2.2.2. Preuve de l'existence de protéines G.	6
3. Les kinases et la transduction du signal.	7
3.1. Chez les cellules animales...	8
3.1.1. Protéines kinases C.	8
3.1.2. Protéines kinases A.	9
3.1.3. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase.	9
3.1.4. Récepteurs à tyrosine kinase.	9
3.1.5. Autres kinases.	10
3.2. Chez les végétaux...	11
3.2.1. Calcium/phospholipid-dependent protein kinase.	11
3.2.2. Calcium/Calmodulin-dependent proteins kinases.	11
3.2.3. Calcium dependent proteins kinases (CDPK).	11
3.2.4. Receptor-like kinases.	12
3.2.5. Autres...	13
Phosphatidylinositol kinases.	13
Protéines kinases A.	13
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS.	14

CHAPITRE 3 : RESULTATS.	15
1. Obtention du matériel (ADNc) de tabac.	15
1.1. Extraction d'ARN total.	15
1.2. Extraction d'ARN messenger.	15
1.3. Synthèse d'ADNc.	15
2. Le clonage de récepteurs à sept domaines transmembranaires.	16
2.1. Stratégie de clonage.	16
2.1.1. Amorces utilisées.	16
2.1.2. Autres amorces.	16
Alignement de séquences en acides aminés de récepteurs à adénosine de cellules animales.	16
Alignement de séquences en acides aminés de récepteurs à acétylcholine de cellules animales.	18
2.2. Tableaux des différentes PCR réalisées.	20
2.2.1. 2ème PCR sur l'ADNc de tabac avec les amorces G prot 2,3,6 et 7b.	21
Concentration des amorces : 10 pM.	21
2.2.2. 1ère PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces G prot 2,3,6 et 7b.	21
Concentration des amorces : 100 pM.	21
2.2.3. 2ème PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces G prot 2,3,6 et 7b.	22
Concentration des amorces : 100 pM.	22
Concentration des amorces : 50 pM.	22
Concentration des amorces : 20 pM.	23
Concentration des amorces : 10 pM.	23
Concentration des amorces : 5 pM.	23
2.3. Clonage dans le vecteur SK ⁺ .	24
2.3.1. Mise au point du rapport Insert/SK ⁺ pour la ligation.	24
2.3.2. Contrôles.	24
2.3.3. Sélection des clones intéressants.	25
2.4. Séquençage : 2 séquences hypothétiques.	25
2.4.1. Clone RCPG 1.	25
2.4.2. Clone RCPG 2.	26
2.5. Analyse des banques de données.	26
2.5.1. Clone RCPG 1.	26
2.5.2. Clone RCPG 2.	27
3. Clonage de kinases chez les végétaux supérieurs.	28
3.1. Rappel bibliographique.	28
3.2. Stratégie de clonage.	28

Table des matières

3.3. Tableaux des différentes PCR réalisées.	32
3.3.1. 2ème PCR sur l'ADNc de tabac avec les amorces KIN R et G.	32
Concentration des amorces : 100 pM.	32
Concentration des amorces : 50 pM.	33
3.3.2. 1ère PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces KIN R et G.	33
Concentration des amorces : 100 pM.	33
Concentration des amorces : 50 pM.	33
3.3.3. 2ème PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces KIN R et G.	34
Concentration des amorces : 100 pM.	34
Concentration des amorces : 50 pM.	34
Concentration des amorces : 20 pM.	34
3.4. Clonage dans le vecteur SK ⁺ .	35
3.4.1. Mise au point du rapport Insert/SK ⁺ pour la ligation.	35
3.4.2. Contrôles.	35
3.4.3. Sélection des clones intéressants.	35
3.5. Séquençage : 2 séquences hypothétiques.	36
3.5.1. Clone 1.	36
3.5.2. Clone 2.	36
3.6. Analyse des banques de données.	36
3.6.1. Clone 1.	36
3.6.2. Clone 2.	38
3.6.3. Alignement des séquences en acides aminés avec des kinases végétales connues.	40
CHAPITRE 4 : DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	43
1. Les Récepteurs couplés aux protéines G.	43
1.1. Rappel des résultats.	43
1.2. Discussion.	43
1.2.1. Protéines G chez les cellules animales.	43
1.2.2. Protéines G chez les cellules végétales.	44
1.2.3. Récepteurs couplés aux protéines G.	45
1.3. Conclusions.	46
1.4. Perspectives.	46
2. Les kinases.	47
2.1. Rappel des résultats.	47
2.2. Discussion.	48
2.3. Perspectives.	50

CHAPITRE 5: MATERIEL ET METHODES.	51
1. Techniques relatives aux cultures cellulaires.	51
1.1. Culture de <i>Nicotiana tabacum</i> .	51
1.2. Culture d' <i>Escherichia coli</i> .	51
1.3. Culture de cellules électrotransformées.	51
2. Techniques relatives aux acides nucleiques.	51
2.1. Extraction d'ARN total à partir de cellules en suspension.	51
2.2. Obtention d'ARN messenger à partir d'ARN total.	52
2.3. Synthèse du premier brin d'ADNc.	53
2.4. PCR.	54
2.4.1. Première PCR.	54
2.4.2. Deuxième PCR.	54
2.5. Extraction d'ADN provenant d'un gel d'agarose.	55
2.6. Enlever les "A" aux extrémités de l'insert et phosphorylation des fragments nucleiques (bouts francs).	55
2.7. Restriction enzymatique.	56
2.7.1. Plasmide.	56
2.7.2. Insert.	56
2.7.3. Elimination des enzymes de restriction.	56
2.8. Déphosphorylation du plasmide.	57
2.9. Ligation.	57
2.10. Isolement de plasmides (mini-prep).	58
2.11. Obtention d' <i>E. Coli</i> électrocompétentes.	58
2.12. Electrotransformation.	59
2.13. Dosage de l'ADN par fluorimétrie.	59
2.14. Séquençage.	60
2.14.1. Réaction de séquençage.	60
2.14.2. Gel de séquençage.	61
2.14.3. Transfert gel de séquençage.	61
2.14.4. Révélation du gel de séquençage (kit-lumigen).	61
2.14.5. Autoradiographie.	62

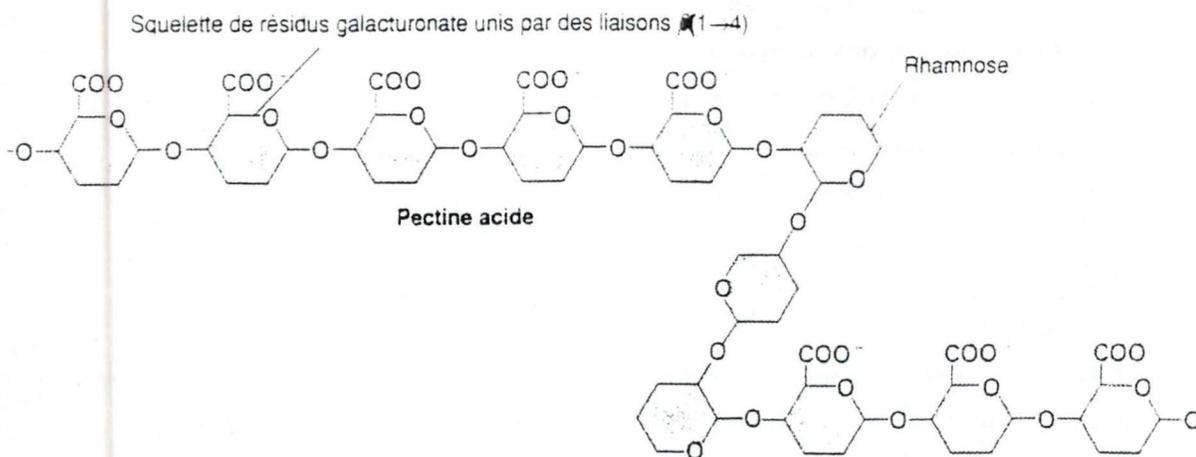


Fig. 1 : La pectine consiste en un squelette de courtes chaînes de galacturonate liées par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ (en violet), chaînes dont les extrémités sont réunies à de courtes chaînes composées de rhamnose (en vert) et de galacturonate (Darnell et al., 1990).

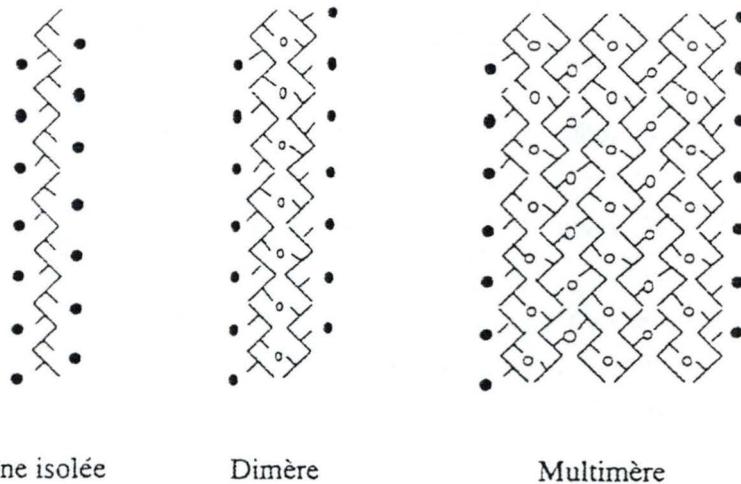


Fig. 2 : Association des chaînes de pectines selon le modèle en egg box (o calcium; • sodium).

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.

Une plante est naturellement exposée à toute une série de stimuli. Parmi ceux-ci, les agressions par des organismes pathogènes divers qui influencent directement la survie de la plante.

Les agressions par des organismes pathogènes aboutissent rarement à la mort de la plante. Celle-ci dispose de tout un arsenal de défense permettant de freiner et stopper l'invasion pathogène.

Un grand nombre de mécanismes de défense ont été répertoriés chez les végétaux supérieurs. Ce qui est moins connu, ce sont les voies de transduction du signal activées par le pathogène lorsque celui-ci entre en contact avec la plante. Quels sont les mécanismes de reconnaissance permettant à la plante de "percevoir" la présence d'un pathogène? Comment ce signal perçu à la surface de la cellule est-il véhiculé au sein du cytoplasme pour activer des réponses de défense?

Dans les pages qui vont suivre, nous décrirons l'interaction d'un pathogène avec la paroi végétale. Nous verrons comment des fragments pectiques déclenchent plusieurs réponses membranaires, cytosoliques et nucléaires avant d'orienter la physiologie cellulaire vers une réponse de défense. Nous focaliserons enfin notre introduction sur deux éléments clés de la transduction du signal : les récepteurs et les kinases.

1. Les pectines : molécule-signal.

La pectine (fig. 1) joue un rôle particulier au sein de la paroi végétale. Elle assure son hydratation et sa structure. De nombreux agents pathogènes afin de traverser la paroi végétale ont développé toute une série d'enzymes pectolytiques. Ces enzymes sont parmi les premières protéines sécrétées par l'agent pathogène entrant en contact avec les parois végétales. Elles provoquent une macération des tissus et une perte d'électrolytes. Ce n'est que lorsque la fraction pectique de la paroi est suffisamment dégradée que d'autres enzymes (cellulases, xylanase, protéase,...) sont sécrétées. Ces dernières sont, en effet, incapables de déstructurer la paroi et de provoquer à elles seules des symptômes d'infections. Durant la dégradation de la pectine par des enzymes pectolytiques, les produits de dégradation de la pectine, ou fragments pectiques, vont jouer le rôle de molécules-signal. Celles-ci seront reconnues par certaines cellules-hôtes et traduites en une information intracellulaire capable d'activer les mécanismes de défense de la plante. De telles molécules capables d'activer une défense cellulaire sont appelées communément des éliciteurs.

Les fonctions élicitrices des fragments pectiques dépendent de leur longueur. En effet, un degré de polymérisation (DP) minimum de neuf et une conformation induite par le calcium (*egg-box*, fig. 2) sont nécessaires pour que les fragments

Introduction

pectiques soient reconnus par les cellules végétales et déclenchent des réactions de défense (Messiaen et *al.*, 1993; Messiaen et Van Cutsem, 1993; Messiaen et Van Cutsem, 1994).

Chez la carotte, l'activation cellulaire débute par des réactions membranaires et cytosoliques. Les fragments pectiques induisent une mobilisation d'ions calcium cytosolique, une dépolarisation membranaire et une acidification cytosolique. Ces réponses sont probablement les premières manifestations cellulaires de la reconnaissance des éliciteurs à la surface du plasmalemme menant par la suite à l'activation de gènes de défense.

La mobilisation d'ions calcium dans le cytosol est déclenchée par l'ouverture de canaux Ca^{2+} indépendants du potentiel de membrane, suivie d'une activation ultérieure de la voie des phosphoinositides (Messiaen, 1994). Ces deux réponses combinées permettraient aux cellules de maintenir une activité en calcium cytosolique élevée sur une période relativement longue (20 minutes). La formation de complexes Ca^{2+} -calmoduline entraînerait les deux autres réponses (dépolarisation membranaire et acidification cytosolique) via une inhibition de la pompe à protons.

Ces trois signaux constituent, au moins, des messagers secondaires indispensables à l'activation de toute une série de gènes de défense ou reliés à la défense. Parmi ces gènes, on trouve ceux codant pour des enzymes intervenant dans la voie des phénylpropanoïdes (PAL : phénylalanine ammonia-lyase, 4CL : 4-coumarate-CoA lyase et CHS : chalcone synthase), des peroxydases, des protéines "pathogenesis related" (glucanase et chitinase), des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) ainsi que quelques enzymes intervenant indirectement dans la synthèse d'éthylène (S'-adénosyl homocysteine hydrolase et S'-adénosyl-méthionine synthase) (Messiaen et Van Cutsem, 1993).

Dans cette voie de transduction du signal particulièrement étudiée au laboratoire, il existe toujours de nombreuses incertitudes. Deux questions primordiales se posent :

- comment un éliciteur est-il reconnu à la surface des cellules ?
- comment se fait le transfert d'information entre la production des messagers secondaires dans le cytosol et l'activation des gènes de défense ?

Chez les cellules animales, la perception de l'information à la surface de la cellule se fait via des récepteurs membranaires (principalement des récepteurs à sept domaines transmembranaires), tandis que de nombreuses kinases participent à l'amplification et au transfert de cette information contribuant à la mise en place des moyens de défense.

Dans les chapitres qui vont suivre, nous examinerons successivement la structure et la fonction des récepteurs à sept domaines transmembranaires et celles des principales kinases connues chez les cellules animales. Nous passerons ensuite en revue les arguments et les résultats de la littérature suggérant ou prouvant l'existence de tels intermédiaires chez les cellules végétales. Nous définirons une stratégie de recherche de nouveaux intermédiaires dans le cadre des recherches menées au laboratoire sur les relations hôte-pathogène.

	I	II	
HGMP07I	MMGQ N QTSISDFLLGLPIQPEQQNLCYALFLAMYITLLIGNLLIIVLIRLDLHSHLHTPMYIFLSNLSFSDLCFSSVTIP		79
DTMT	MTEK N QTVVSEFVLLGLPIDPDQRDLFYALFLAMYVTTILGNLLIIVLIQLDHLHTPMYIFLSNLSFSDLCFSSVTMP		79
OLFI15	MTE N QTVISQFLLFLPISEHQHVFYALFLSMYLTTLVGNLIIIIHLHLSHLHTPMYIFLSNLSFSDLCFSSVTMP		79
OLFF3	MDSS N RTRVSEFLLGLFVENKDLQPLIYGLFLSMYIVTVIGNISIIIVAIISDPCLHTPMYIFLSNLSFSDLCFSTTVP		79
HGMP07J	MLLCFRFC N QSMKRE N FTLITDFVFGQFSSFHEQQITLPGVFLALYILTLAGNIIIVPIIRIDILHSHLHTPMYIFLSMSTSETVYVTLVILP		90
	* * * * *	* * * * *	
	III	IV	
HGMP07I	KLLQNMQNQDPSIPYADCLTQMYFFLLFGDLESFLLVAMAYDRYVAICFPLHYTAIMSPMLCLVALVSWVLTTFHAMLIHTPLMARLQFC		169
DTMT	KLLQNMQSQVPSIPYAGCLTQMYFFLLFGDLESFLLVAMAYDRYVAICFPLHYTTIMSPKLCFSLVLSWVLTTFHAVIHTPLMARLQFC		169
OLFI15	KLLQNMQSQVPSIPFAGCLTQLYFFLYFADLESFLLVAMAYDRYVAICFPLHYMSIMSPKLCVSLVLSWVLTTFHAMLIHTPLMARLQFC		169
OLFF3	KMLVNIQTQNNVITYAGCITQIYFFLLFVELDNFLLTIMAYDRYVAICHPMHYTVIMNYKCGFLVLSWVLSVLIHALFQSLMMIALPFC		169
HGMP07J	RMLSSLVGMSPMSLAGCATQMFVVTFGITNCFLLTAMGYDRYVAICNPLRYMVMNKRLRIQLVIGACISGLIIVATQVTSVVERLQFC		180
	* * * * *	* * * * *	
	V	VI	
HGMP07I	ADNVI P HFFCDMSALLKLAFSDTRVNEWVIFIMGGLILVIFPILLIGSYARIVSSILKVPSSK G ICKAFSTCGSHLSVVSIFYCTPIGLY		259
DTMT	A-NT I P H FFCDMSALLKLACSDTQVNELVIFIMGGLILVIFPILLITSYARIVSSILKVP S AIGICKV F STCGSHLSVVSIFYCTPIGLY		258
OLFI15	ADN M I P HFFCDISPLKLSCDTHVNELVIFVMGGLVIVIFPVLII V SYARVVASILKVP S VRG L HK F STCGSHLSVVSIFYCTPIGLY		259
OLFF3	THLE I P H YFCEPNQVIQLTCSDAFLNDLVIFYTLVLLATVPLAGIFSYFKVIVSSICA I SSVH G KYKAFSTCASHLSVVSIFYCTPIGLY		259
HGMP07J	ARK-V P HFFCDIRPVMKLSCIDTTVNEILLTIVSVLVVPPMGLVFI S VVLI S T L KIASVEGRK K AFATCASHLTVVIVHYS C AST A Y		269
	* * * * *	* * * * *	
	VII		
HGMP07I	LCSSANSSTLKDTVMAMMYTVVTPML N PF I YSLRNRDMK G ALSRV I HQK T FFSL	314	
DTMT	LCPSANNSTVKETIMAMMYTVVTPML N PF I YSLRNRDMK G ALRRV I CR K K I TF S V	313	
OLFI15	LCPSANNSTVKETVMAMMYTVVTPML N PF I YSLRNRDM K EAL I RV L C K KK I TF C L	314	
OLFF3	LSSAANNSSQASATASV M YTVVTP M V N PF I YSLRNRD V KSV L KK T L C EEV I RSPP S LL H FF V L C HL P CF I CF Y	333	
HGMP07J	L K PK S ENT R EH D QL S V T Y T V I T P LL N P V V T LR N KE V K D AL C RA V G G K F S	320	
	* * * * *		

Fig. 3 : Alignement de séquences peptidiques de récepteurs olfactifs (OLFI15 et OLFF3), de récepteurs exprimés dans les testicules chez l'homme 5HGMP07I et HGMP07J) et dans les cellules spermatiques chez le chien 5DTMT). Les barres et les chiffres romains représentent les segments transmembranaires. Les astérisques et les points situés en-dessous de l'alignement indiquent respectivement des résidus identiques et des résidus conservés. Les sites de glycosylation sont soulignés (Parmentier et al., 1992).

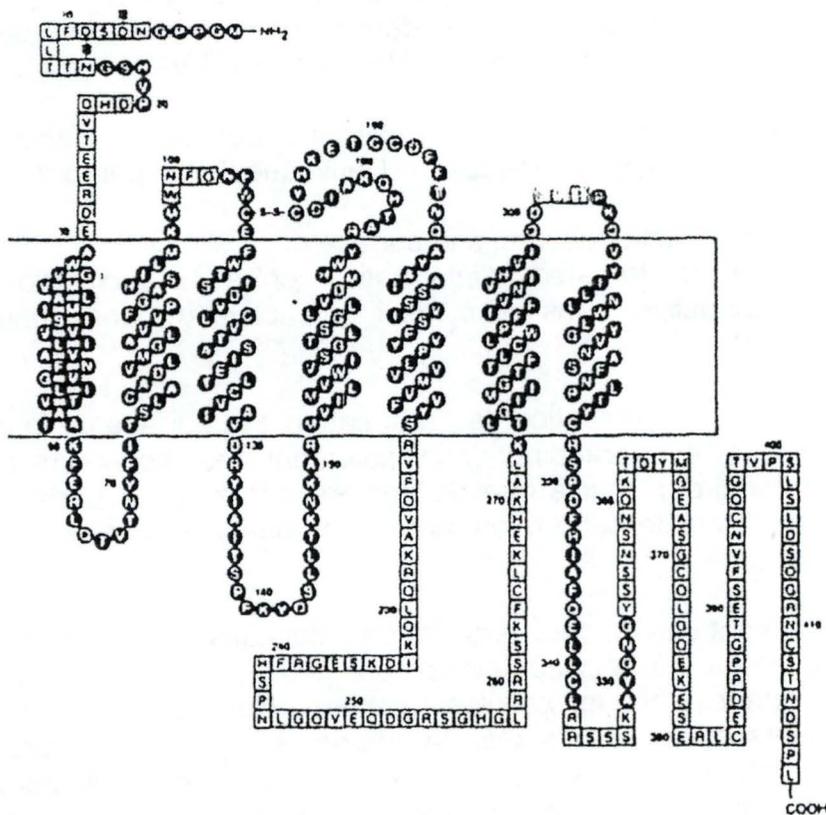


Fig. 4 : Modèle bidimensionnel du récepteur β_2 -adrénergique de hamster. Les résidus représentés par des carrés peuvent être supprimés sans que le récepteur perde sa capacité à fixer les ligands. Ils correspondent essentiellement aux boucles hydrophiles. La suppression de l'un des domaines transmembranaires conduit à une structure ne complexant plus les ligands. A, alanine; D, aspartate; E, glutamate; F, phénylalanine; G, glycine; I, isoleucine; K, lysine; M, méthionine; N, asparagine; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; L, leucine; P, proline; W, tryptophane; C, cystéine; Y, tyrosine; H, histidine. (Hibert et al., 1993)

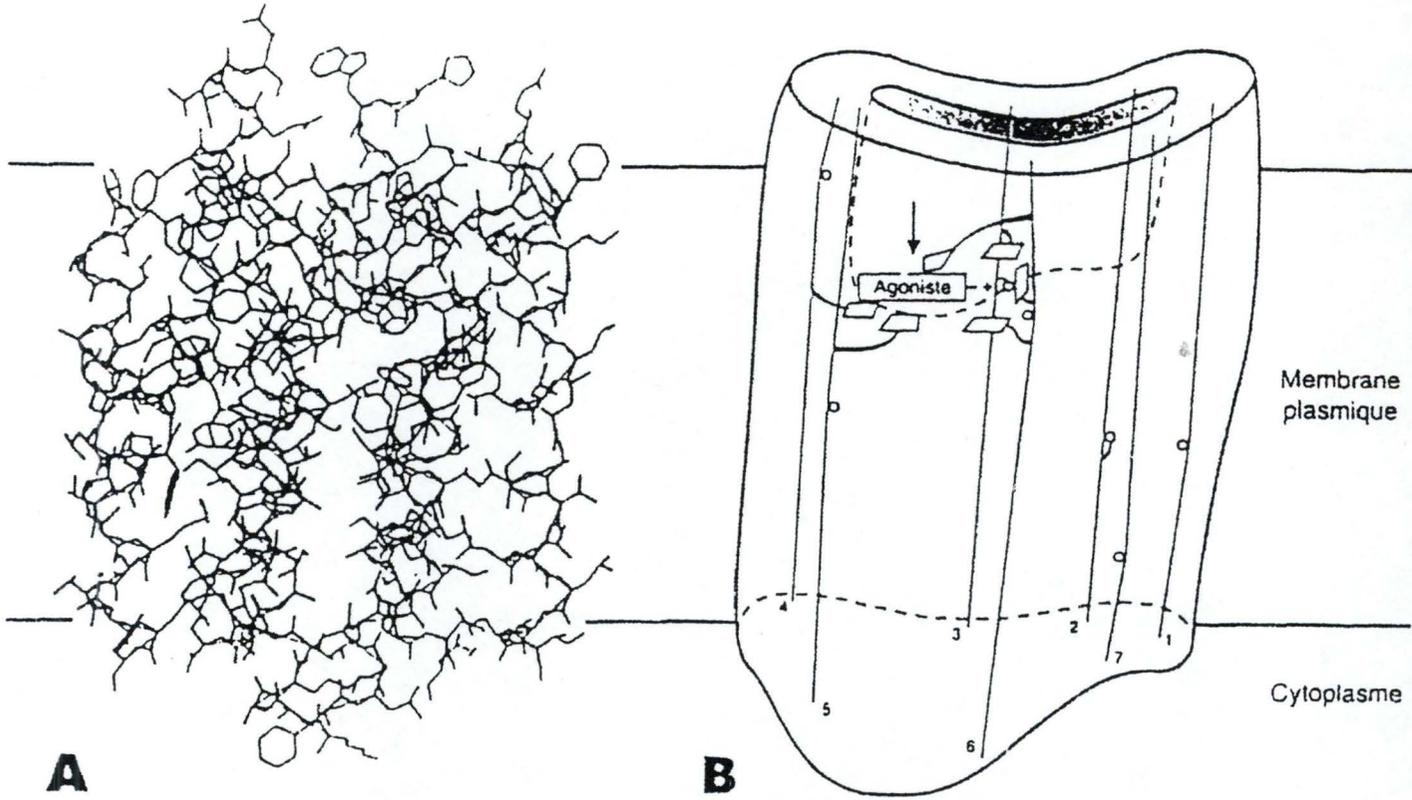


Fig. 5 : Modèles en trois dimension des récepteurs couplés aux protéines G interagissant avec des neurotransmetteurs carioniques. **A.** Représentation atomique. **B.** Représentation schématique : les sept domaines transmembranaires sont des structures en hélice- α dont l'axe principal est représenté. Elles sont numérotées de 1 à 7 (Hibert et *al.*, 1993).

2. Les récepteurs à sept domaines membranaires ou récepteurs à protéines G.

2.1. Chez les cellules animales...

Plus de 60 récepteurs différents appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ont été clonés et séquencés. Il apparaît que tous ces récepteurs présentent des homologies se situant tant au niveau de leurs séquences peptidiques que de leur ADN.

2.1.1. Structures primaire et secondaire des récepteurs à sept domaines membranaires.

L'alignement des séquences en acides aminés des RCPG a permis d'identifier sept domaines relativement bien conservés (Parmentier *et al.*, 1992; Libert *et al.*, 1989; Hibert *et al.*, 1993) (fig. 3). L'homologie (identité ou similarité) entre récepteur est cependant très variable (6 à 63%). Une analyse globale des profils d'hydrophobicité permet d'identifier sept segments hydrophobes transmembranaires d'une vingtaine d'acides aminés correspondant aux sept domaines conservés identifiés par alignement (Hibert *et al.*, 1993). Ces régions hydrophobes sont composées d'acides aminés dont les chaînes latérales hydrophobes interagissent avec les phospholipides membranaires.

2.1.2. Prédiction de la structure secondaire.

L'analyse de la composition en acides aminés des sept régions transmembranaires suggère que chacune forme une hélice α (Hibert *et al.* 1993) (fig. 4)

La partie amino-terminale du récepteur est probablement toujours extracellulaire, tandis que la partie carboxy-terminale est intracellulaire. La boucle intracellulaire reliant les hélices 5 et 6 et la partie carboxy-terminale de la protéine interagit vraisemblablement avec une protéine G (Hibert *et al.* 1993).

2.1.3. Structure tridimensionnelle des RCPG.

En se basant sur la structure primaire des RCPG et le modèle tridimensionnel de la bactériorhodopsine, un modèle tridimensionnel des RCPG a été proposé.

La bactériorhodopsine est une protéine transmembranaire composée de sept hélices α transmembranaires. Malgré le fait que cette protéine ne possède aucune homologie de séquence avec les RCPG, son mode d'action par photo-isomérisation est similaire à celui des opsines de mammifères appartenant à la famille des RCPG (Hibert *et al.*, 1993). De cette modélisation, on peut suggérer que les RCPG ont les caractéristiques suivantes : sept hélices α très étroitement accolées et définissant une fente centrale diédrique, étroite et profonde de 20 Å (fig. 5). Les résidus chargés et conservés sont localisés au coeur de la protéine.

Au fond de cette fente, nous pouvons observer une poche hydrophobe délimitée par les hélices 3,4,5 et 6. Elles contiennent tous les résidus impliqués dans le processus de reconnaissance récepteur-médiateur. Ces résidus sont :

- Asparagine (Asn) 311 de l'hélice 3, il n'est conservé que dans les récepteurs activés par des neurotransmetteurs.
- Sérine (Ser) 505 et 508 de l'hélice 5, impliqués dans la fixation des catécholamines.

Il est postulé que cette région correspond au site de liaison des agonistes (Hibert et al., 1993).

2.1.4. Les protéines G.

Après avoir interagi avec un ligand, les RCPG changent de conformation et interagissent avec des protéines G. Ces protéines G sont par définition des protéines liant le GTP. Elles sont spécialisées dans le transfert d'information de la membrane plasmique vers le cytosol.

Les protéines G sont constituées de 3 sous-unités (α , β et γ). Le poids moléculaire de l'hétérodimère est de 90 kd. Les sous-unités α , β , γ ont respectivement 39-52 kd, 35-37 et 7-10 kd (Barrit, 1994).

Les sous-unités $\beta\gamma$ forment un dimère dissociable uniquement par dénaturation. Ce dimère possède un site de liaison pour la sous-unité α et un autre site de liaison pour une enzyme ou un canal ionique (Simon et al., 1991). Il possède également des séquences hydrophiles et hydrophobes qui facilitent l'ancrage de la sous-unité α à la membrane cytoplasmique (Barritt, 1994; Dolph et al., 1994).

La sous-unité α contient un site de liaison pour le GTP, un site de liaison pour le récepteur et un autre pour le dimère $\beta\gamma$. Elle est fixée à la membrane par un résidu cystéine acylé situé à l'extrémité carboxy-terminale. A cette même extrémité, nous avons également une hélice α amphipathique qui interagit avec le récepteur (Barrit, 1994; Sternweis et Smrcka, 1992; Kaziro et al, 1991). Plusieurs isoformes de la sous-unité α ont été identifiées et subdivisées en différentes classes. Quatre sous-familles de sous-unités α ont été ainsi définies.

Tableau 1 : isoformes de la sous-unité α . (Neer, 1995)

Classes	Membres	Toxines influentes	Certaines fonctions
α_s	α_s, α_{olf}	Cholera	Stimule l'adénylate cyclase
α_i	$\alpha_{i-1}, \alpha_{i-2}, \alpha_{i-3}, \alpha_o, \alpha_{t-1}, \alpha_{t-2}, \alpha_{gust}, \alpha_z$	Pertussique (sauf sur α_z)	inhibe l'adénylate cyclase régule les canaux Ca^{2+} et K^+ active cGMP phosphodiesterase
α_q	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$		active la PLC.
α_{12}	α_{12}, α_{13}		régule les échanges Na^+/K^+

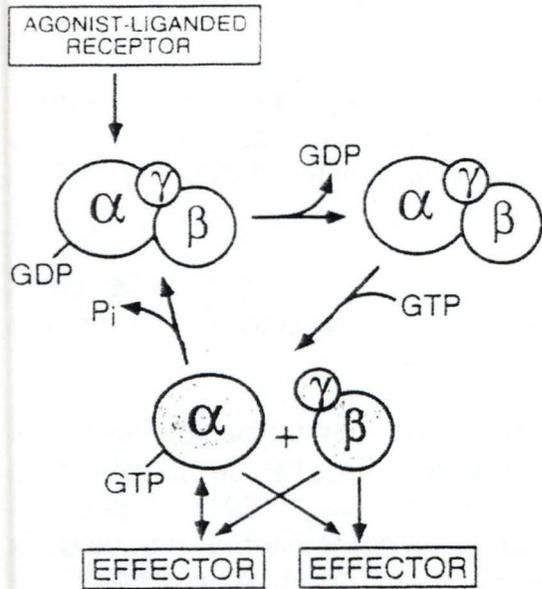


Fig. 6 : Le cycle du GTP (guanosine triphosphate). (Neer, 1995).

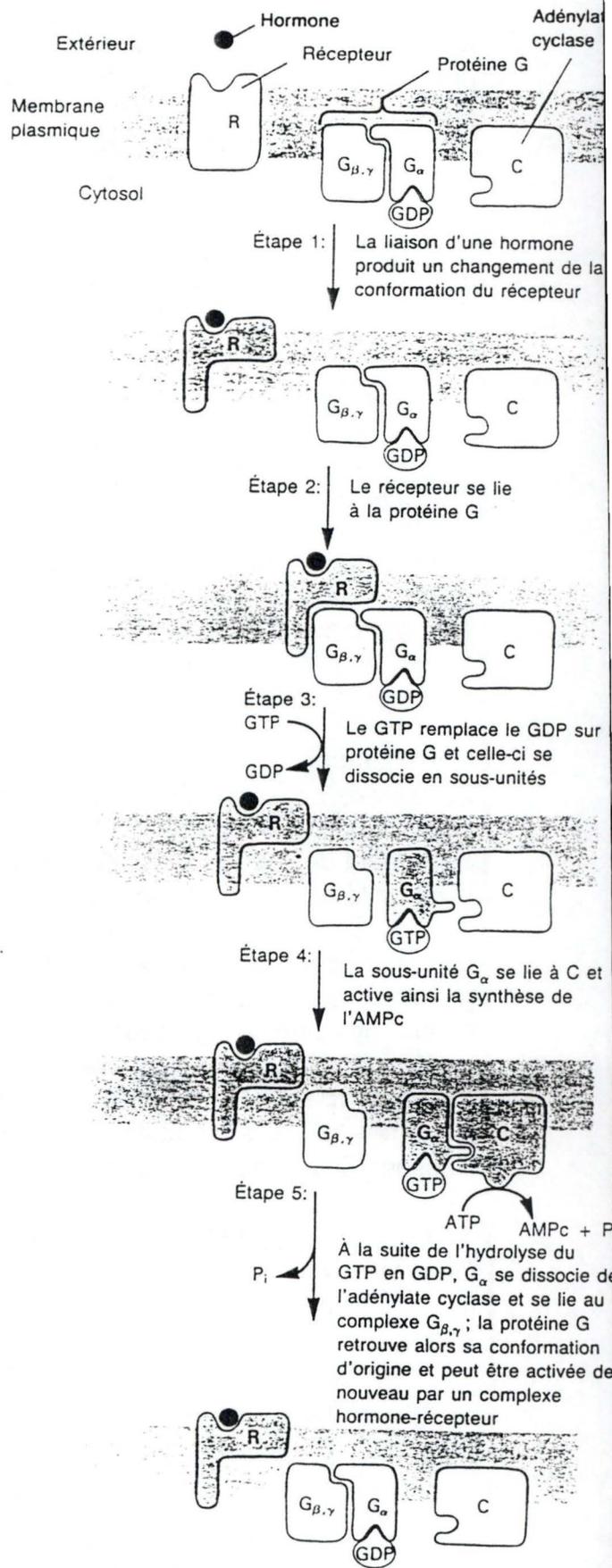


Fig. 7 : Cycle de la protéine G. Interaction avec le récepteur et l'adénylate cyclase (Darnell et al 1990).

Introduction

Elles ont toutes une activité hydrolytique bien que le niveau d'hydrolyse du GTP varie d'une sous-unité à une autre.

Mode d'action des protéines G.

Quand un signal chimique ou physique stimule le récepteur, celui-ci entre dans sa conformation active. Le récepteur devient accessible à la protéine G. Lors de l'interaction entre la protéine G et le récepteur, la sous-unité α de l'hétérodimère change de conformation. Ce changement provoque une diminution de son affinité pour le GDP. Le GDP est remplacé par du GTP qui se trouve en concentration supérieure dans le cytoplasme. Dès que le GTP se lie, la sous-unité α se dissocie à la fois du récepteur et du dimère $\beta\gamma$. La sous-unité α et le dimère $\beta\gamma$ restent actifs jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP par l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α (fig. 6). Le dimère $\beta\gamma$ ainsi que la sous-unité α activée peuvent interagir avec d'autres protéines. Dès que le GTP est hydrolysé, ils s'associent de nouveau. L'hétérodimère reformé, ainsi que le récepteur reviennent dans leur conformation inactive (Neer, 1995) (fig. 7).

2.1.5. Les enzymes et canaux ioniques qui interagissent avec les RCPG.

Le tableau ci-dessous reprend les principales enzymes et canaux ioniques qui interagissent avec des RCPG.

Tableau 2 : enzymes interagissant avec les RCPG. (Barritt, 1994)

Canaux ioniques et enzymes	Récepteurs
Adénylate cyclase	Agoniste β -adrénergique Glucagon Vasopressin (V_2) Prostaglandine E_2
GMP cyclique phosphodiesterase	Rhodopsine
Phospholipase C	Acétylcholine (muscarinic) Vasopressin (V_1) Agoniste α_1 -adrénergique Thrombine
Phospholipase A_2	Agoniste α_1 -adrénergique
NADPH oxidase	f-met-leu-phe
Canaux potassiques	Acétylcholine (muscarinic)
Canaux calciques dépendant du voltage	Agoniste α_2 -adrénergique

2.2. Chez les végétaux...

2.2.1. Indications de l'existence de RCPG.

Contrairement aux cellules animales, aucun récepteur à sept domaines transmembranaires n'a été identifié chez les végétaux. Il existe cependant de

Introduction

nombreux résultats dans la littérature suggérant, de manière indirecte, la présence de telles molécules.

Exemple 1 : récepteur à auxine.

Bennet et *al.* (1994), auraient isolé le gène AUX1 responsable de la croissance racinaire chez *Arabidopsis thaliana* par la méthode "T-DNA tagging". Ce gène aurait été isolé dans une population d'*Arabidopsis thaliana* transformée par *Agrobacterium tumefaciens* : les plantes présentant une déficience dans la croissance des racines après insertion du T-DNA ont été retenues pour des analyses ultérieures. Le gène AUX-1 coderait pour une protéine de type RCPG responsable de la reconnaissance de l'auxine. Toutefois, le fait que ces résultats n'aient été publiés que sous forme d'un abstract suggère une difficulté à prouver que le gène cloné code effectivement pour un RCPG.

Exemple 2 : récepteurs et flux de potassium.

Armstrong et Blatt (1995) ont pu contrôler l'influx d'ion K^+ dans des cellules de garde de *Vicia* au moyen de Mas-7, un analogue du mastoparan, un tétradécapeptide capable de mimer la troisième boucle intracellulaire d'un RCPG activé par son ligand. L'action du Mas-7 se traduit effectivement par une stimulation de l'activité GTPasique de la protéine G correspondante.

Exemple 3 : récepteurs de β -glucanes fongiques.

Cosio et *al.* (1990), ont identifié une fraction membranaire de soja contenant un site de liaison de très haute affinité pour un éliciteur fongique de type β -glucanes. Les tentatives de purification biochimique de ce "récepteur" dans le but de faire du microséquençage sont restées infructueuses.

2.2.2. Preuve de l'existence de protéines G.

Un gène codant pour une sous-unité α d'une protéine G a été isolé chez *Arabidopsis thaliana*. Ce gène nommé GPA1 code pour une protéine de 383 acides aminés.

La structure globale de GPA1, comparée aux sous-unités α mammaliennes, comporte 36 % d'identité et 73 % d'homologie. La comparaison des exons et des introns de GPA1 avec ceux des sous-unités α mammaliennes montre que certaines jonctions exon-intron sont conservées (fig.8) (Kaziro et *al.*, 1991).

La technique de PCR (*polymerase chain reaction*) a permis de mettre en évidence d'autres sous-unités α chez les végétaux. Le tableau ci-dessous regroupe deux sous-unités α et deux sous-unités β mises en évidence par PCR en utilisant des amorces dégénérées provenant d'alignement de séquences des sous-unités α et β chez les cellules mammaliennes (Ma, 1994).

Introduction

Tableau 3 : Sous-unité α et β mise en évidence par PCR.

Plantes	Protéines	Tailles (kd)	Similarité avec les ^a protéines animales (%)	Expressions et/ou fonctions
<u>sous-unité α</u>				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GP α 1	44.6	Gt1 (36)	Exprimé dans tous les organes principaux
<i>Lycopersicon esculentum</i>	TG α 1	44.9	Gt1 (34)	
<u>sous-unité β</u>				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AG β 1	41.0	β 2 (44)	Exprimé dans de nombreux organes
<i>Zea mays</i>	ZG β 1	41.7	β 2 (42)	Exprimé dans de nombreux organes

^aGt1 : transducine de cellules en bâtonnet; β 2 est une sous-unité β humaine (Ma, 1994)

D'autres protéines similaires aux sous-unités β des animaux et des eukaryotes simples ont été détectées. Ces protéines présentent sept répétitions d'un même motif : WD40. WD40 est un dipeptide tryptophane-asparate répété 40 fois. Trois gènes ont été isolés chez les plantes portant de telles séquences, mais ils n'ont que 25 % d'homologie avec les séquences connues des sous-unités β (MA, 1994).

Tableau 4 : Trois exemples de protéines comportant le motif WD40.

Plantes	Protéines	Tailles (kd)	Similarité avec les ^a protéines animales (%)	Expressions et/ou fonctions
<u>protéinesWD-40</u>				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	COP1	111.8	β 3 (29) ^b	Transduction du signal émis par la lumière
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cblp	35.1	MHC12.3 (66)	Exprimé constitutivement
<i>Nicotiana tabacum</i>	arcA	35.8	MHC12.3 (67)	Régulé par l'auxine

^a β 3 est une sous-unité β humaine et MHC12.3 est une protéine provenant du poulet

^b Le pourcentage d'identité est seulement pour le domaine WD-40 de COP1 (MA, 1994)

3. Les kinases et la transduction du signal.

De nombreuses kinases ont été identifiées chez la plupart des êtres vivants. Dans le cadre spécifique de la transduction du signal, les kinases constituent des cascades d'amplification de l'information à l'intérieur de la cellule. Les kinases (et les phosphatases) constituent donc un mécanisme de régulation très fin de

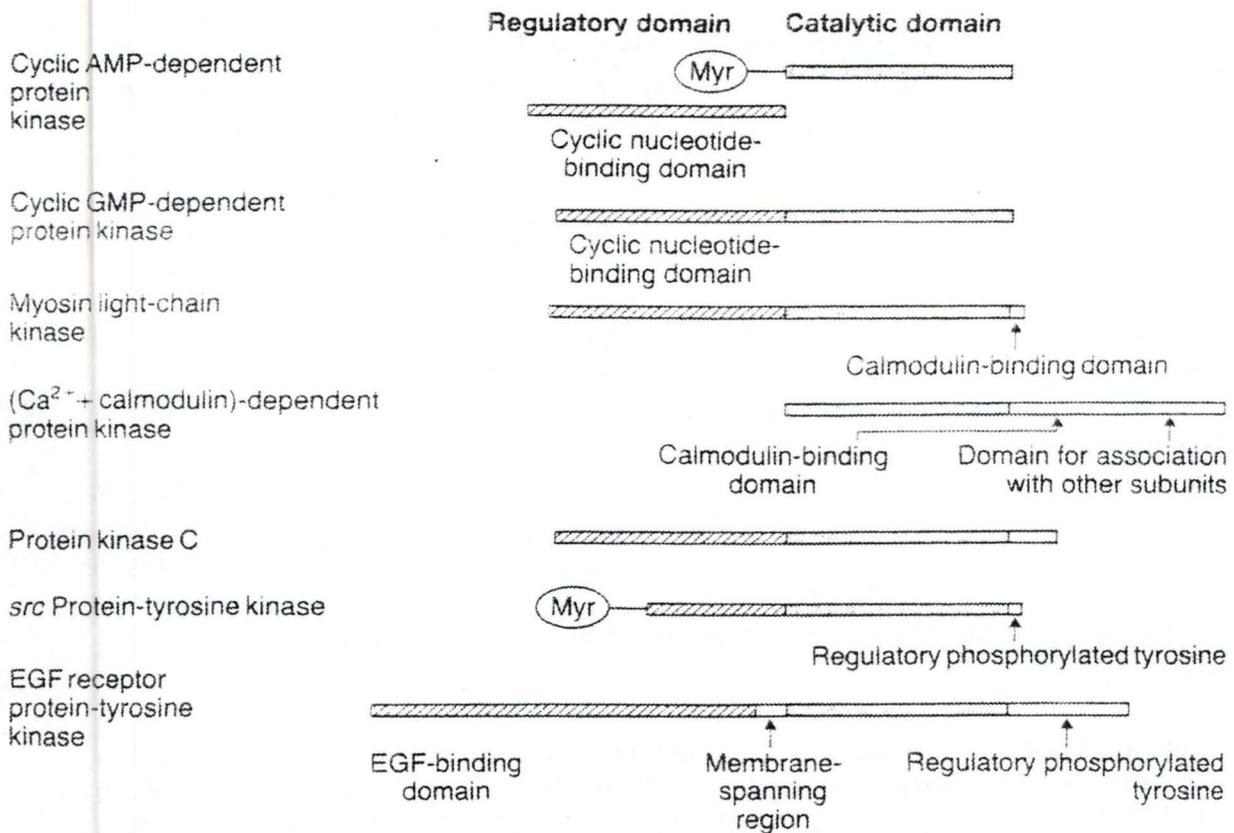


Fig. 9 : Principales kinases impliquées dans la transduction du signal chez les cellules animales (Barritt, 1994).

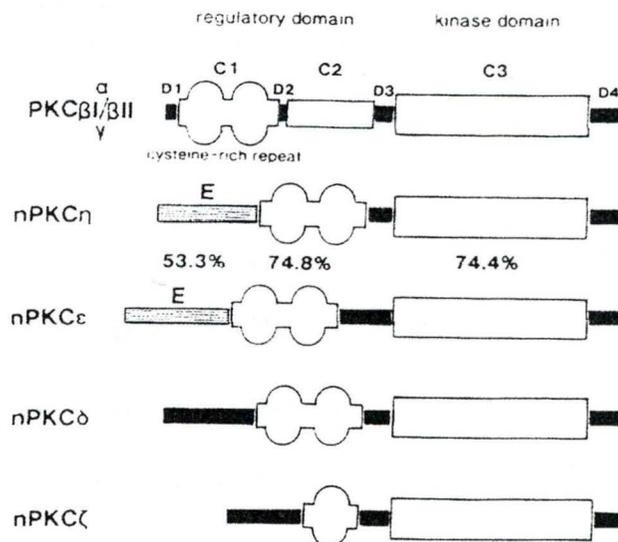


Fig. 10 : Structure de différentes PKC et comparaison entre nPKC_η et nPKC_ε. Les valeurs en pourcentage représentent les identités pour chacune des régions (Osada et al., 1990).

différentes voies de transduction du signal et de beaucoup de processus physiologiques.

Les kinases ont pour fonction de phosphoryler un substrat afin de l'activer ou de le désactiver. Cette phosphorylation a lieu sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine (Taylor et al., 1993).

Dans les paragraphes suivants, nous allons décrire les principales kinases (fig. 9) impliquées dans la transduction du signal chez les cellules animales, ainsi que leurs équivalents probables chez les végétaux.

3.1. Chez les cellules animales...

3.1.1. Protéines kinases C.

Les protéines kinases C (PKC) sont en général des protéines phosphorylant les résidus sérine/thréonine et elles sont dépendantes des phospholipides, du calcium et du diacylglycérol (DAG). La PKC est une enzyme-clé dans de nombreuses voies de transduction du signal telles que la cascade de l'AMPC et la voie des phosphoinositides (Berridge, 1993).

Il existe un grand nombre d'isoenzymes de PKC : α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , η , ξ . Contrairement aux isoformes α , β , γ , les isoformes ϵ , δ , θ et η sont indépendantes du Ca^{2+} , tandis que l'isoforme ξ est indépendante du Ca^{2+} et du DAG (Dekker, 1994).

Des études biochimiques et génétiques indiquent que les PKC peuvent être divisées en deux domaines distincts (régulateur et catalytique) dans lesquels on retrouve trois régions conservées ($C_1 \rightarrow C_3$) et quatre régions variables ($D_1 \rightarrow D_4$) (fig. 10).

Le domaine régulateur se trouve dans la partie amino-terminale de l'enzyme (région $C_1 \rightarrow D_3$). Ce domaine contient en C_1 des sites d'interactions avec un phospholipide (phosphatidylsérine), avec le DAG et avec les esters de phorbol. Le site d'interaction avec les esters de phorbol contient 2 zones riches en cystéine (Burns et Bell 1994). En C_2 , se trouve le site de liaison du Ca^{2+} . Une région E supplémentaire est présente chez certaines kinases. Aucun rôle ne lui a encore été décerné (Osada et al., 1990).

Le domaine catalytique (région $C_3 \rightarrow D_4$) se trouve dans la partie carboxy-terminale. On y trouve les sites de liaison de l'ATP et du substrat (Ohno, 1987; Inagaki, 1987).

Dans sa forme inactive, le site actif de la PKC est occupé par un pseudosubstrat. La conformation de la protéine change après l'activation par des lipides, le DAG (diacylglycérol) et le Ca^{2+} . L'activation est accompagnée d'une translocation de la protéine du cytosol vers la membrane plasmique (Dekker, 1994). Le changement de conformation provoque la dissociation du pseudosubstrat du domaine catalytique. Un certain degré d'interaction entre le site actif et le pseudo-substrat

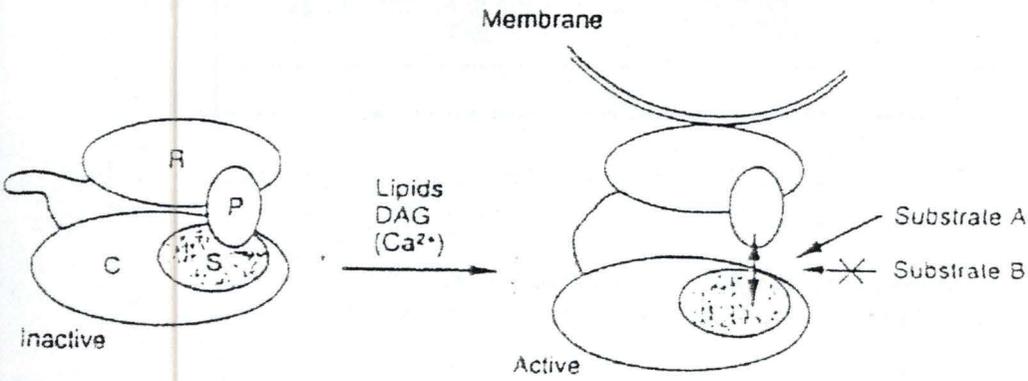


Fig. 11 : Modèle d'activation et de sélectivité des PKC. C : domaine catalytique; R : domaine régulateur; P : site du pseudosubstrat; S : poche où le substrat se lie (Dekker L.V. et Parker P.J., 1994).

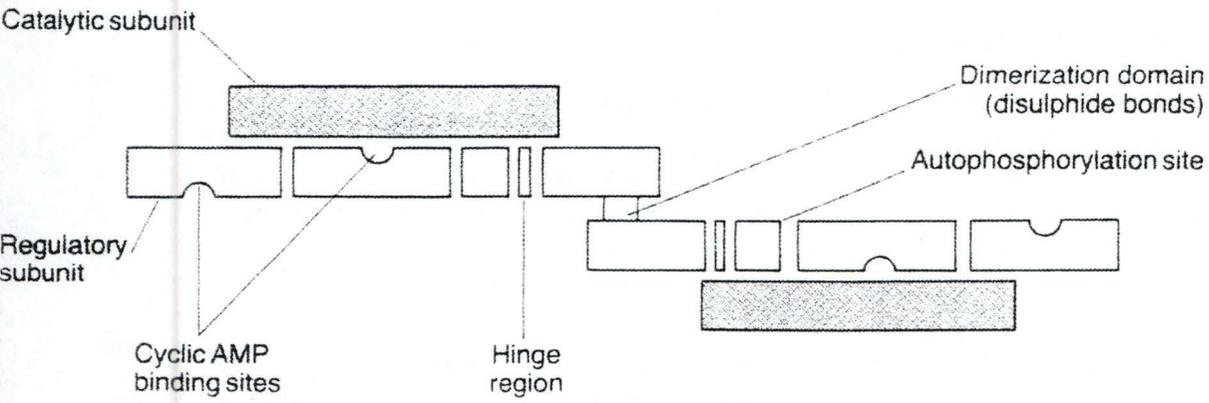


Fig. 12 : domaines des sous-unités régulatrices chez les PKA (Barritt, 1994).

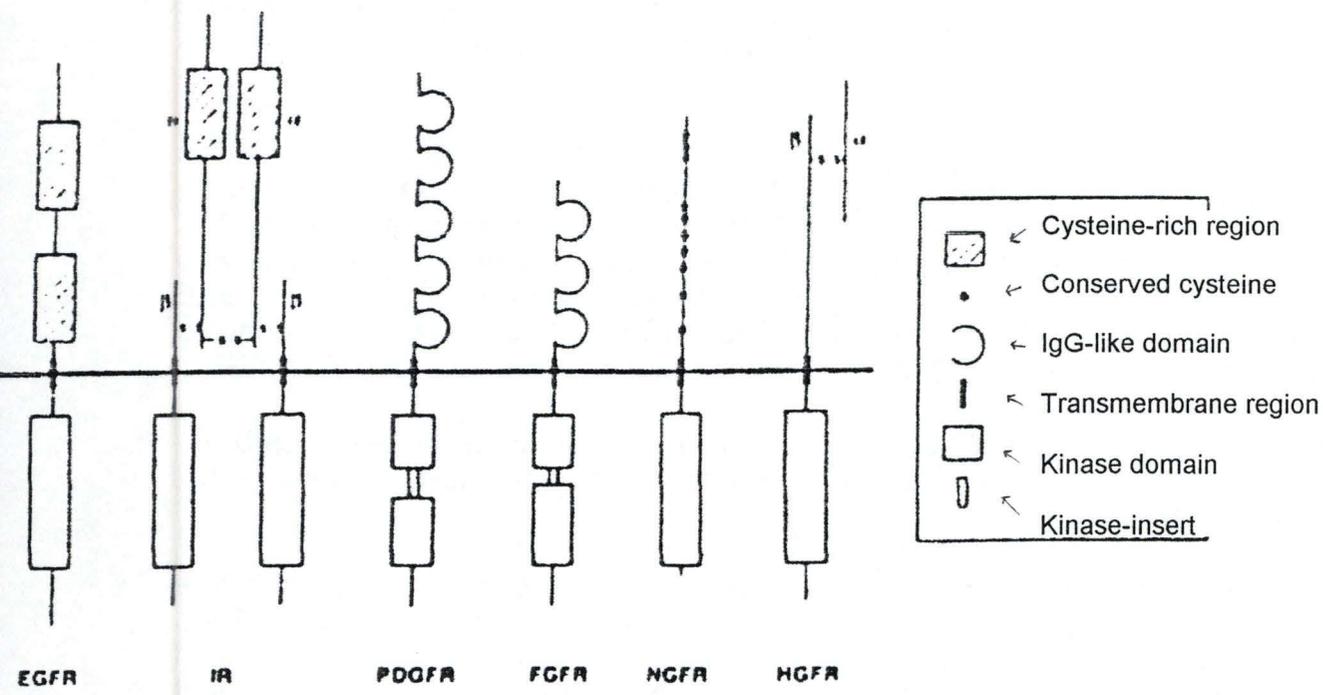


Fig. 13 : Récepteurs et leurs structures. EGFR : epidermal growth factor receptor; IR : insulin receptor; PDGFR : platelet derivated growth factor receptor; FGFR : fibroblast growth factor receptor; NGFR : nerve growth factor receptor; HGFR : hepatocyte growth factor receptor (Panayotou, Waterfield, 1993).

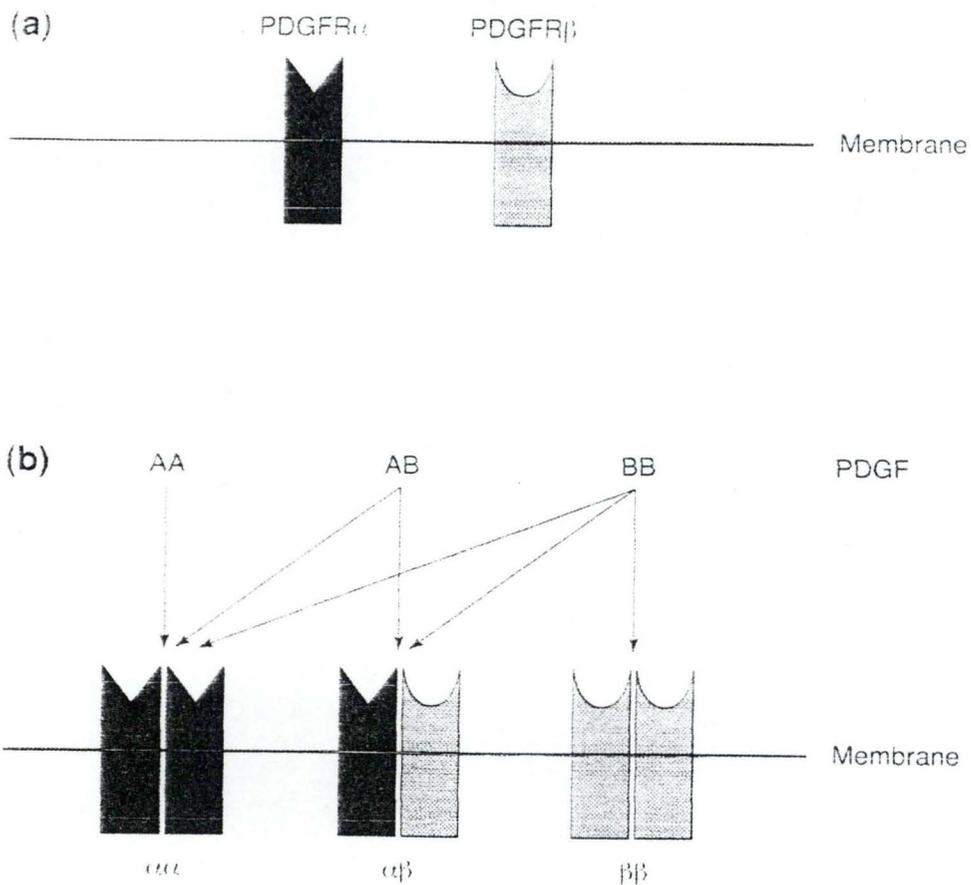
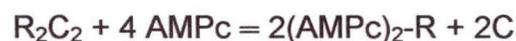


Fig. 14 : Les PDGF (*platelet derived growth factor*) et les PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*). **A.** Les 2 types de PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*). **B.** $\alpha\alpha$ et $\beta\beta$ sont deux homodimères, $\alpha\beta$ est un hétérodimère. AA, AB, BB sont trois ligands. AA se lie seulement sur le récepteur $\alpha\alpha$; AB peut se lier au récepteur $\alpha\alpha$ et au récepteur $\alpha\beta$; BB peut se lier au récepteur $\alpha\alpha$, au récepteur $\alpha\beta$ et au récepteur $\beta\beta$ (Lemmon et Schlessinger, 1994).

persiste cependant afin de ne phosphoryler que le bon substrat (Dekker, 1994). (fig.11).

3.1.2. Protéines kinases A.

La protéine kinase A est une protéine dimérique capable de fixer l'AMPc. Chaque monomère est composé d'une sous-unité catalytique (C) et d'une sous-unité régulatrice (R). Deux isoformes (I et II) ont été caractérisées jusqu'à présent. Chaque sous-unité régulatrice comporte deux sites de liaison de l'AMPc, un domaine assurant la dimérisation et un domaine interagissant avec le site actif de la sous-unité catalytique (fig. 12). En présence d'AMPc, les sous-unités régulatrices libèrent le site actif des sous-unités catalytiques :



La PKA joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques chez les cellules animales : métabolisme du glycogène et des lipides, la synthèse d'ARN et la contraction musculaire, pour ne citer que les plus connus (Barritt, 1994).

3.1.3. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase.

Cette kinase est activée par les complexes Ca-calmoduline et non par les nucléotides cycliques.

Chez les cellules animales, ces kinases contrôlent la dynamique du cytosquelette, le métabolisme du glycogène, la synthèse d'ARN et la contraction musculaire. Il existe différentes isoformes de (Ca-CaM) DPK principalement différenciées par leur spécificité de substrat.

3.1.4. Les récepteurs à tyrosine kinase.

Les récepteurs à tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires ayant à la fois une fonction de récepteur et une fonction kinase. Chez les cellules animales, un grand nombre de ces récepteurs interagissent avec des facteurs de croissance (Epidermal Growth Factor, Insulin-like Growth Factor, Colony Stimulating Factor, Platelet Derived Growth Factor, Fibroblast Growth factor) (fig. 13).

Tous les récepteurs à tyrosine kinase contiennent un domaine extracellulaire interagissant avec un ligand, une région transmembranaire ancrant la protéine dans la membrane, et un domaine intracellulaire contenant le site catalytique tyrosine kinase et plusieurs séquences régulatrices qui sont sujettes à l'autophosphorylation (Lemmon et Schlessinger, 1994).

Lorsqu' un ligand se fixe sur le domaine extracellulaire de la tyrosine kinase, le récepteur se dimérise. Cette dimérisation peut se faire avec un récepteur de même nature (homodimérisation) ou avec un récepteur de nature différente (hétérodimérisation) (fig. 14). L'hétérodimérisation est particulièrement

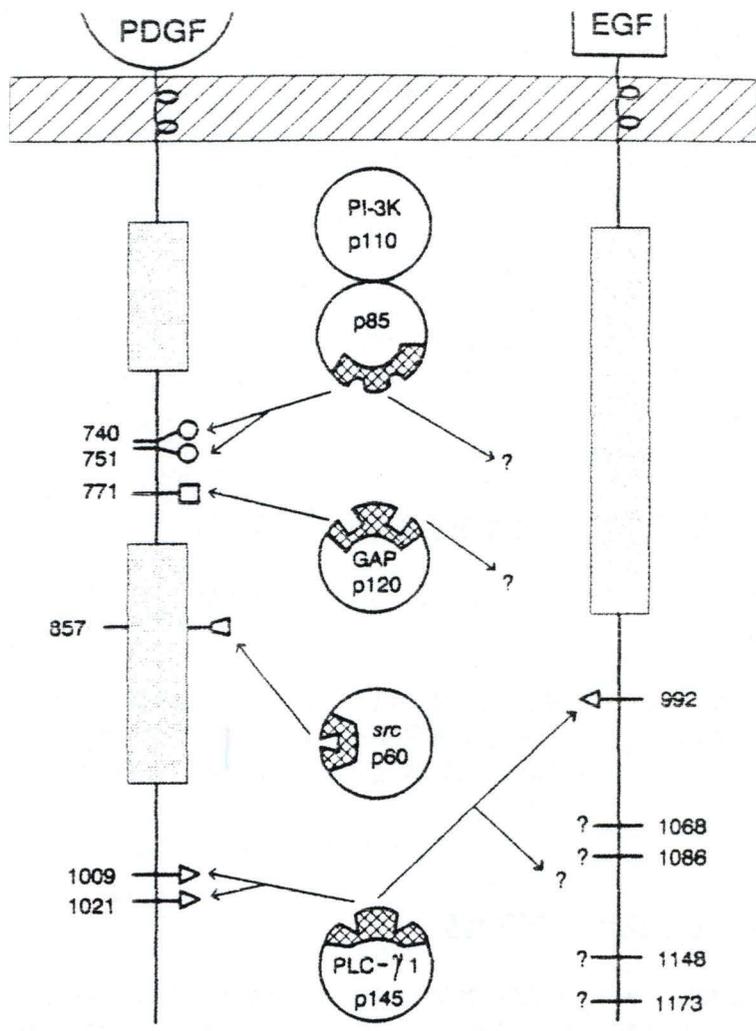


Fig. 15 : Différentes protéines ayant un domaine SH2 (en hachuré) (Carpenter, 1992).

Introduction

intéressante car elle permet à la cellule de réguler beaucoup plus finement les différents processus physiologiques sous contrôle de récepteurs à tyrosine kinase.

La dimérisation du récepteur entraîne l'activation du domaine kinase de la partie cytoplasmique du récepteur et l'autophosphorylation de résidus tyrosines se trouvant au niveau de l'extrémité carboxy-terminale cytoplasmique du récepteur. Cette autophosphorylation induit un changement de conformation du domaine kinase augmentant ainsi son activité (Hsu et *al.*, 1991).

Les principaux effecteurs activés par les récepteurs à tyrosine kinase sont la PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase), la GAP (Ras GTPase-activating protein) et la PLC- γ 1 (Phospholipase C- γ 1) (Carpenter, 1992). L'interaction de ces effecteurs avec l'extrémité carboxy-terminale cytoplasmique du récepteur se fait via des domaines SH2 possédant une grande affinité pour les tyrosines phosphorylées (Chardin, 1994). Les récepteurs autophosphorylés servent donc de ligand pour les protéines ayant ce domaine (fig. 15) (Mayer et Baltimore, 1993). La liaison de l'effecteur au récepteur tyrosine kinase facilite la phosphorylation de ce premier.

3.1.5. Autres kinases.

Le tableau ci-dessous reprend un ensemble de kinases intervenant entre autres dans la synthèse des protéines, la dynamique du cytosquelette, le métabolisme du glycogène, la vision, pour ne citer que les plus caractéristiques.

Tableau 5 : Différentes protéines kinases.

Protéines kinases	Agent(s) régulateur	protéines cibles
eIF-2 α (dépendante de l'ARN double brin)	ARN double brin	eIF-2 α (facteur d'initiation eucaryotique 2)
eIF-2 α kinase (dépendante de l'haémine)	Haémine	eIF-2 α
p34 kinase	Protéines codées par les gènes <i>wee1</i> , <i>cdc25</i> , <i>suc1</i> et par les cyclines	ARN polymérase II Histone H1
MAP kinase	MAP (microtubule-associated protein) kinases	Kinase S6 II
Kinase ribosomale S6	Autres protéines kinases	Sous-unité ribosomale 40S
Pyruvate déshydrogénase kinase	Acétyl-CoA, NADH, pyruvate, ADP	Complexe pyruvate déshydrogénase
<i>Branched chain α-ketoacid dehydrogenase kinase</i>	Pas connu	<i>Branched chain α-ketoacid dehydrogenase</i>
Protéines kinases dépendantes des polyamines	Polyamines	Pas connues
Caséines kinases 1 et 2	pas connu	Caséine, glycogène synthétase
Caséine kinase 2 (glycogène synthétase kinase 5)	Pas connu	Facteurs d'initiation
Glycogènes synthétases kinases 3 et 5	Pas connu	Glycogène synthétase

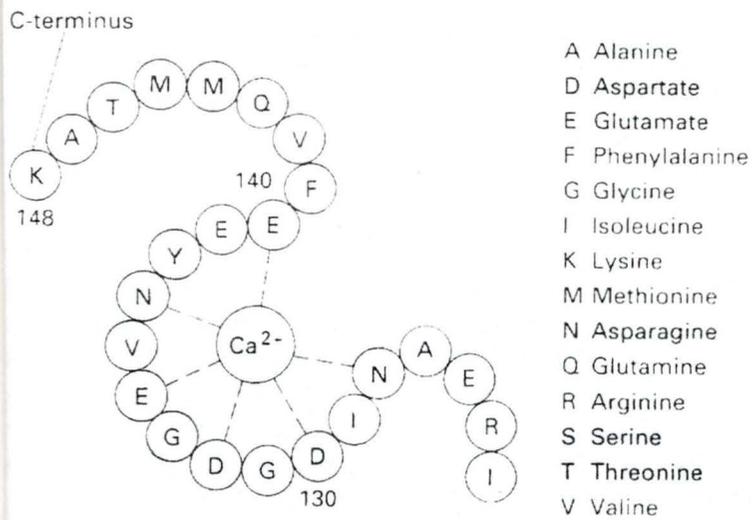


Fig. 16 : Chaque site de fixation de calcium (EF-hands) forme une boucle contenant des résidus aspartate, glutamate et asparagine qui complexent le calcium en faisant des liaisons ioniques ; les atomes O de résidus thréonine et sérine participent aussi à la fixation du calcium (Darnell et al., 1990).

Introduction

Protéines kinases	Agent(s) régulateur	protéines cibles
Rhodopsine kinase	Lumière	Rhodopsine
Récepteur β -adrénergique kinase	Pas connu	Récepteur β -adrénergique
Kinase activée par l'AMP Kinase dépendante du cGMP	AMP	Acétyl-CoA carboxylase

3.2. Chez les végétaux...

3.2.1. Calcium/phospholipid-dependent protein kinase (PKC-like).

Masuda et al. (1994) ont décrit cette kinase dans des feuilles de riz. Elle est dépendante du calcium, de la phosphatidylsérine et du TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate). Ils l'ont classée dans les PKC-like car elle est activée en présence du TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) et inhibée par la carbophostine comme les PKC d'origine animale.

Une autre kinase dépendante du Ca^{2+} et de la phosphatidylsérine (PS) a été également mise en évidence chez le soja (Honda et al., 1994).

3.2.2. Calcium/Calmodulin-dependent proteins kinases.

Les kinases du groupe CaMK comprennent les kinases dépendantes des complexes Ca^{2+} -calmoduline et les kinases SNF1 activées par l'AMPc.

Parmi les Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases, nous avons, entre autres, la NAD kinase qui catalyse la conversion du NAD en NADP. L'activité de cette kinase est régulée par une modification post-transcriptionnelle (triméthylation du résidu lysine en position 115) de la calmoduline (Robert et al., 1990).

SNF1 est une sérine-thréonine kinase chez *S. Cerevisiae*. Des homologues de SNF1 ont été trouvés chez les mammifères où des concentrations élevées en AMP sont nécessaires pour son activation. Cette condition n'est remplie qu'en état de stress. Des homologues de SNF1 ont été également identifiés chez un certain nombre d'espèces végétales, notamment, le tabac. Cette kinase est comme chez les mammifères exprimée en condition de stress (Stone et Walker, 1995).

3.2.3. Calcium dependent proteins kinases (CDPK)

Les CDPK sont des protéines monomériques. Ces protéines possèdent un site catalytique et un domaine de régulation *calmodulin-like* relié par une région de jonction (± 30 acides aminés). Le domaine de régulation possède 1 à 4 sites EF-hand de fixation du Ca^{2+} (fig. 16).

La région amino-terminale est de longueur variable, elle est riche en acides aminés hydrophobes. Elle possède un site de myristoylation qui cible les protéines activées vers la membrane plasmique.

La zone de jonction joue le rôle de pseudosubstrat en se liant au domaine catalytique. Lorsque le Ca^{2+} vient se fixer sur le domaine *calmodulin-like*, ce domaine déplace le domaine de jonction (par interaction intramoléculaire), libérant ainsi le site catalytique (Lindzen et al., 1995; Breviario et al., 1995).

Par localisation immunocytochimique, Harmon et Mc Curdy (1990), ont pu montrer que cette kinase était largement membranaire, était également associée intimement avec l'actine F chez *Chara* où elle jouerait un rôle important au niveau de la dynamique du cytosquelette de la cellule.

L'activité de la nitrate réductase (NR) est également régulée par une CDPK (Bachmann et al., 1995).

3.2.4. Receptor-like kinases.

Ce sont des sérines/thréonines kinases.

Tous les *receptor-like kinases* identifiés chez les végétaux à ce jour contiennent trois domaines:

- un domaine extracellulaire qui interagit avec un ligand potentiel
- un domaine transmembranaire
- un domaine cytoplasmique ayant une activité kinase.

Sur ce dernier domaine se trouvent des résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylés.

En se basant sur la séquence en acide aminé des domaines extracellulaires, trois classes de *receptor-like kinase* ont été identifiées :

- les *S locus glycoproteins* (SLG_s) : elles interviennent dans les interactions d'incompatibilité pollen et stigma.
- les *S locus receptor kinases* (SRK_s) : ils sont spécifiques des tissus reproducteurs et interviennent dans les interactions d'incompatibilité pollen et stigma.
- les *leucin-rich repeats* (LRR_s) : ils sont impliqués dans la reconnaissance entre protéines. Ces séquences sont présentes également chez les vertébrés et les invertébrés.

La similitude avec les autres types de kinases se limite au domaine cytoplasmique responsable de l'activité kinase.

Mu et al. (1994) ont décrit un *recepteur-like kinase* se trouvant dans les tubes polliniques et possédant une activité sérine/thréonine et tyrosine kinase. Il appartient à la classe des LRR_s.

Walker et Zhang (1994) ont identifié de l'ADNc de maïs codant pour une sérine/thréonine kinase. Celle-ci peut être classée dans les SLG_s par comparaison avec les SLG_s de *Brassica*.

Ces *réceptor-like kinase* semblent être l'équivalent végétal des récepteurs à tyrosine kinase chez les cellules animales.

3.2.5. Autres...

Phosphatidylinositol kinase.

C'est une kinase qui intervient dans le turnover des dérivés de l'inositol et, par conséquent, une enzyme importante dans la voie des phosphoinositides.

Kamada et *al.* (1994) ont montré qu'un éliciteur préparé à partir de la paroi végétale d'un champignon pathogène (*Phytophthora nicotianae*) stimule le turnover de l'inositol (dans des cultures en suspension de cellules de tabac) suivi de l'induction de l'activité PAL (phénylalanine ammonia-lyase), enzyme-clé de la voie des phénylpropanoïdes.

Yang et *al.* (1992) décrivent le rôle d'une phosphatidylinositol 4-kinase. Elle catalyse, en position 4, la phosphorylation du phosphoinositol pour former le phosphatidylinositol 4-monophosphate (PI-4P) qui sert de précurseur à la voie des phosphoinositides. La PI-P4K peut également augmenter la polymérisation de l'actine et stimuler des pompes à ions.

Protéines kinases A

Jusqu'à présent, aucun équivalent des PKA n'ont été caractérisés ou clonés chez les végétaux supérieurs.

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS.

Le but de ce travail est l'identification préliminaire d'intermédiaires potentiels de la voie de transduction du signal chez les végétaux supérieurs. Nous avons focalisé notre recherche sur deux familles d'intermédiaires : les récepteurs à sept domaines transmembranaires et les kinases.

De nombreuses approches indirectes ont permis de suggérer la présence de récepteurs à sept domaines transmembranaires chez les végétaux supérieurs (Bennet et *al.*, 1994; Armstrong et Blatt, 1995; voir introduction). Les recherches actuelles réalisées dans un nombre limité de laboratoires n'ont pas permis de purifier de telles molécules par les voies chromatographiques classiques.

Il existe cependant une approche originale de clonage de tels récepteurs chez les cellules animales mise au point par Parmentier et *al.* (1992) et Hibert et *al.* (1993). Cette technique consiste à définir des amorces dégénérées au niveau des régions transmembranaires de récepteurs connus et d'amplifier de nouveaux fragments d'ADN par PCR en espérant identifier de nouvelles familles de récepteurs. De nombreux récepteurs dits "orphelins" ont pu ainsi être clonés chez les cellules animales.

Nous avons décidé d'éprouver l'efficacité de cette approche PCR chez les végétaux supérieurs. Nous avons ainsi utilisé des amorces PCR définies par l'équipe du Dr. Parmentier (Hôpital Erasme, Bruxelles) et, d'autres, définies au laboratoire par alignement de séquences de récepteurs de cellules animales.

Une approche similaire a été adoptée pour l'identification de kinases chez les végétaux supérieurs.

Une telle stratégie de clonage permettra de tester le rôle éventuel de ces intermédiaires dans différents modèles cellulaires de transduction du signal bien établis au laboratoire.

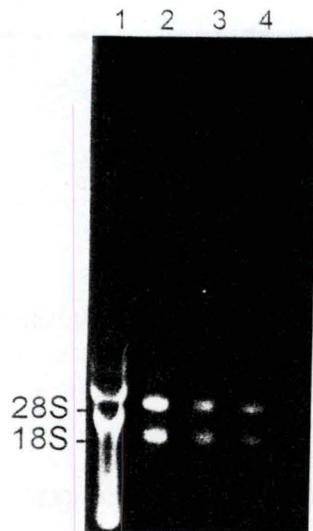


Fig. 17 : ARN total sur gel d'agarose 1%. Piste 1 : dilution 1x; piste 2 : dilution 20x; piste 3 : dilution 35x; piste 4 : dilution 45x.

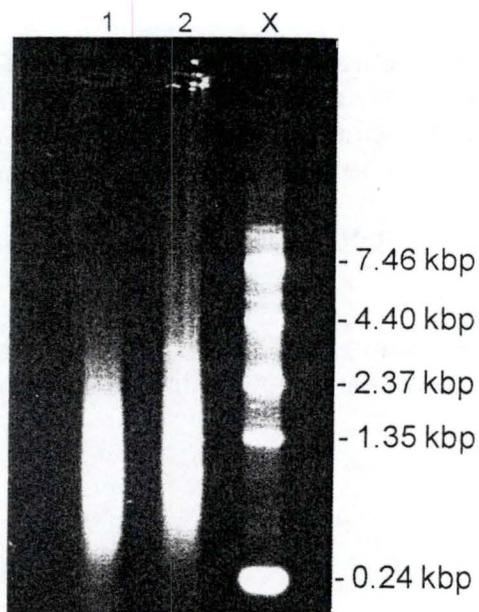


Fig. 18 : ARN messenger sur gel agarose 1%. Piste 1 et 2 : ARN messenger; piste 3 : marqueur de taille.

CHAPITRE 3 : RESULTATS.

Le travail effectué peut être divisé en trois parties :

- Obtention du matériel (ADNc) de tabac (*Nicotiana tabacum*) pour les PCR.
- Clonage de récepteurs à sept domaines transmembranaires.
- Clonage de kinases chez les végétaux supérieurs.

1. Obtention du matériel (ADNc) de tabac.

1.1. Extraction d'ARN total.

A partir de cultures de cellules de tabac (*Nicotiana tabacum*) en suspension, nous avons extrait de l'ARN total. Afin de vérifier que cet ARN ne se soit pas dégradé au cours des différentes manipulations, nous l'avons observé sur gel DNA agarose 1%. La figure 17 montre quatre pistes. Ces quatre pistes correspondent à un même échantillon, mais à des concentrations différentes. La piste 1, dilution 1x; la piste 2, dilution 20x; la piste 3, dilution 35x, la piste 4, dilution 45x. Dans chacune de ces pistes nous pouvons observer 2 bandes. Ces bandes correspondent aux ARN ribosomiaux (28S et 18S).

1.2. Extraction d'ARN messenger.

Sachant que l'ARN total n'est pas dégradé, on peut extraire l'ARN messenger. L'extraction d'ARN messenger se fait en passant l'échantillon sur une colonne oligo(dT). La particularité de cette colonne réside en sa matrice sur laquelle sont greffées de nombreuses extrémités polyT. Lors de l'élution de l'ARN total, l'ARN messenger par son extrémité polyA va s'y fixer. Le passage du tampon d'élution permet d'éluer cet ARN messenger. Il peut alors être dosé et observé sur gel. La figure 18, nous montre de l'ARN messenger. Les pistes 1 et 2 correspondent à deux échantillons différents. La piste 3 est un marqueur de taille.

1.3. Synthèse de l'ADNc.

L'étape suivante consiste à faire de l'ADNc à partir de l'ARN messenger obtenu. Cet ADNc va servir comme matériel de base dans les réactions de PCR. Toutes les synthèses de l'ADNc premier brin ont été effectuées à partir de 1 µg d'ARN messenger pour un volume de 20 µl.

2. Le clonage de récepteurs à sept domaines transmembranaires.

2.1. Stratégie de clonage.

Dans un premier temps, nous allons définir les amorces pour les PCR. Par la suite, nous allons réaliser de nombreuses PCR avec différentes concentrations de ces amorces. Les amorces seront utilisées à des concentrations de 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 5pM, 1pM. Nous utiliserons également de l'ADNc et de l'ADN génomique de tabac.

2.1.1. Amorces utilisées.

Ces amorces nous ont été aimablement communiquées par le Dr. PARMENTIER de l'hôpital Erasme.

G prot 2 : 5'-TAGATCTAGACYTGKCS5KBGCY GAYMT-3'

G prot 3 : 5'-TAGATCTAGACAT5RS5SYKGASMGSTRC-3'

G prot 6 : 5'-ACTTAAGCTTAGGGCAGCCAGCAGAKSBYRAA-3'

G prot 7b : 5'-ACTTAAGCTTG CARTARMHSA5RGGRTT-3'

2.1.2. Autres amorces.

Nous allons définir d'autres amorces plus spécifiques que celles du Dr. Parmentier. En effet, ces dernières amorces ont été définies à partir de séquences de différents récepteurs. Maintenant, nous allons définir des amorces à partir de séquences d'un même type de récepteur. Ces récepteurs seront des récepteurs à adénosine et acétylcholine qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires..

Alignement de séquences en acides aminés de récepteurs à adénosine de cellules animales.

Des séquences en acides aminés de différents récepteurs à adénosine identifiés chez les cellules animales ont été alignées dans le but de définir des amorces PCR dégénérées afin d'identifier la présence de tels récepteurs chez les cellules végétales.

	1				50
Adeno3pro	MPPSISAFQA	AYIGIEVLIA	LVSVPGNVLV	IWAVKVNQAL	RDATFCFIVS
Adeno5pro	MPHSVSAFQA	AYIGIEVLIA	LVSVPGNVLV	IWAVKVNQAL	RDATFCFIAS
Adeno6pro	MPPYISAFQA	AYIGIEVLIA	LVSVPGNVLV	IWAVKVNQAL	RDATFCFIVS
Adeno1pro	MPPSISAFQA	AYIGIEVLIA	LVSVPGNVLV	IWAVKVNQAL	RDATFCFIVS
Adeno2pro	MPPSISAFQA	AYIGIEVLIA	LVSVPGNVLV	IWAVKVNQAL	RDATFCFIVS
Adeno4pro	MGSSV.....	.YITVELAIA	VLAAILGNVLV	CWAVWLNSNL	QNV'TNYFVVS
	51				100
Adeno3pro	LAVADVAVGA	LVIPLAILIN	IGPQTYFHTC	LMVACPVLIL	TQSSILALLA
Adeno5pro	LAVADVAVGA	LVIPLAILIN	IGPQTYFHTC	LMVACPVLIL	TQSSILALLA

Résultats

Adeno6pro	LAVADVAVGA	LVIPLAILIN	IGPQTYFHTC	LMVACPVLIL	TQSSILALLA
Adeno1pro	LAVADVAVGA	LVIPLAILIN	IGPRTYFHTC	LKVACPVLIL	TQSSILALLA
Adeno2pro	LAVADVAVGA	LVIPLAILIN	IGPETYFHTC	LMVACPVLIL	TQSSILALLA
Adeno4pro	LAAADIAVGV	LAIPFAITIS	TGFCACHGC	LFIACFVLVL	TQSSIFSLLA

101

150

Adeno3pro	IADVRYLRVK	IPLRYKMVVT	PRRAAVAIAG	CWILSFVVGL	TPMFGWNNLS
Adeno5pro	IADVRYLRVK	IPLRYKTVVT	PRRAAVAIAG	CWILSLVVGL	TPMFGWNNLS
Adeno6pro	IADVRYLRVK	IPLRYKTVVT	QRRRAVAIAG	CWILSLVVGL	TPMFGWNNLS
Adeno1pro	IADVRYLRVK	IPLRYKTVVT	PRRAVVAITG	CWILSFVVGL	TPMFGWNNLS
Adeno2pro	IADVRYLRVK	IPLRYKAVVT	PRRAAVAIAG	CWILSLVVGL	TPMFGWNNLR
Adeno4pro	IAIDRYIAIR	IPLRYNGLVT	GTRAKGIIAI	CWVLSFAIGL	TPMLGWNNCG

151

200

Adeno3pro	AVERAWAANG	SMGEPVIKCE	FEKVISMEYM	VYFNFFVWVL	PPLLLMVLIY
Adeno5pro	KIEMAWAANG	SVGEPVIKCE	FEKVISMEYM	VYFNFFVWVL	PPLLLMVLIY
Adeno6pro	VVEQDWRANG	SVGEPVIKCE	FEKVISMEYM	VYFNFFVWVL	PPLLLMVLIY
Adeno1pro	AVERDWLANG	SVGEPVIECQ	FEKVISMEYM	VYFNFFVWVL	PPLLLMVLIY
Adeno2pro	EVQRAWAANG	SVGEPVIKCE	FEKVISMEYM	VYFNFFVWVL	PPLLLMVLIY
Adeno4pro	QPKEGKNHSQ	GCGEGQVACL	FEDVVPMNMY	VYFNFFACVL	VPLLLMLGVY

201

250

Adeno3pro	LEV FYLIRKQ	LNKKVSA..S	SGDPQKYYGK	ELKIAKSLAL	ILFLFALS WL
Adeno5pro	LEV FYLIRKQ	LSKKVSA..S	SGDPQKYYGK	ELKIAKSLAL	ILFLFALS WL
Adeno6pro	LEV FYLIRKQ	LNKKVSA..S	SGDPQKYYGK	ELKIAKSLAL	ILFLFALS WL
Adeno1pro	MEV FYLIRKQ	LSKKVSA..S	SGDPQKYYGK	ELKIAKSLAL	ILFLFALS WL
Adeno2pro	LEV FYLIRRQ	LSKKASA..S	SGDPHKYYGK	ELKIAKSLAL	ILFLFALS WL
Adeno4pro	LRIFLAARRQ	LQMESQPLP	GERARSTLQK	EVHAAKSLAI	IVGLFALCWL

251

300

Adeno3pro	PLHILNCITL	FCPSC.HKPS	ILTYIAIFLT	HGNSAMNPIV	YAFRIQKFRV
Adeno5pro	PLHILNCITL	FCPTC.HKPT	ILTYIAIFLT	HGNSAMNPIV	YAFRIQKFRV
Adeno6pro	PLHILNCITL	FCPTC.QKPS	ILTYIAIFLT	HGNSAMNPIV	YAFRIHKFRV
Adeno1pro	PLHILNCITL	FCPSC.HMPR	ILTYIAIFLS	HGNSAMNPIV	YAFRIQKFRV
Adeno2pro	PLHILNCVTL	FCPSC.QKPS	ILVYTAIFLT	HGNSAMNPIV	YAFRIHKFRV
Adeno4pro	PLHIINCFTF	FCPDCSHAPL	WLMYLAIVLS	HTNSVVPFI	YAYRIREFRQ

301

350

Adeno3pro	TFLKIWNDFH	RCQPAP...P	..IDEDLPEE	RPDD.....
Adeno5pro	TFLKIWNDFH	RCQPEP...P	..IDEDLPEE	KVDD.....
Adeno6pro	TFLKIWNDFH	RCQPKP...P	..IDEDLPEE	KAED.....
Adeno1pro	TFLKIWNDFH	RCQPAP...P	..IDEDAPAE	RPDD.....
Adeno2pro	TFLKIWNDFH	RCRPAP...A	GDGDEDLPEE	KPND.....
Adeno4pro	TFRKIIRSHV	LRQQEPFKAA	GTSARVLA AH	GSDGEQVSLR	LNGHPPGVWA

351

400

Adeno3pro
Adeno5pro
Adeno6pro
Adeno1pro
Adeno2pro

Résultats

Adeno4pro NGSAPHPERR PNGYALGLVS GGSAQESQGN TGLPDVELLS HELKGVCEPEP
 401 415
 Adeno3pro
 Adeno5pro
 Adeno6pro
 Adeno1pro
 Adeno2pro
 Adeno4pro PGLDDPLAQD GAGVS

Les amorces définies et utilisées (en couleurs) sont :

Adeno 3 : 5'-TAGATCTAGATAYATGGTNTAYTTYAAAYTTYTTY-3'

Adeno 7 : 5'-ACTTAAGCTTRTTCATNGCNSWRTNCC-3'

Alignement de séquences en acides aminés de récepteurs à acétylcholine de cellules animales.

Nous avons aligné des séquences en acides aminés provenant de récepteurs à acétylcholine identifiés chez les cellules animales. L'alignement de séquences a permis de classifier les amorces PCR dégénérées qui seront utilisées.

	1				50
Acetyl3proMNTS	APPAVSPNIT	VLAPGKGPWQ	VAFIGITTGL	LSLATVTGNL
Acetyl4proMNTS	VPPAVSPNIT	VLAPGKGPWQ	VAFIGSTTGL	LSLATVTGNL
Acetyl2pro	MEGDSYHNAT	TVNGTPVNHQ	PLER.HRLWE	VITIAAVTAV	VSLITIVGNV
Acetyl5pro	MEGESY.NES	TVNGTPVNHQ	ALER.HGLWE	VITIAVVTAV	VSLMTIVGNV
Acetyl1proMNNST	YINSSSENI	ALESPYKTIE	VVFIVLVAGS	LSLVTIIGNI
	51				100
Acetyl3pro	LVLISFKVNT	ELKTVNNYFL	LSLACADLII	GTFSMNLYTT	YLLMGHWALG
Acetyl4pro	LVLISIKVNT	ELKTVNNYFL	LSLACADLII	GTFSMNLYTT	YLLMGHWALG
Acetyl2pro	LVMISFKVNS	QLKTVNNYL	LSLACADLII	GIFSMNLYTT	YILMGRWALG
Acetyl5pro	LVMISFKVNS	QLKTVNNYL	LSLACADLII	GIFSMNLYTT	YILMGRWVLG
Acetyl1pro	LVMVSIKVR	HLQTVNNYFL	FSLACADLII	GIFSMNLYTL	YTVIGYWPLG
	101				150
Acetyl3pro	TLACDLWLAL	DYVASNASVM	NLLLISFDY	FSVTRPLSYR	AKRTPPRAAL
Acetyl4pro	TLACDLWLAL	DYVASNASVM	NLLLISFDY	FSVTRPLSYR	AKRTPPRAAL
Acetyl2pro	SLACDLWLAL	DYVASNASVM	NLLVISFDY	FSITRPLTYR	AKRTPKRAGI
Acetyl5pro	SLACDLWLAL	DYVASNASVM	NLLVISFDY	FSITRPLTYR	AKRTPKRAGI
Acetyl1pro	PVVCDLWLAL	DYVSNASVM	NLLIISFDY	FCVTKPLTYP	VKRTTKMAGM
	151				200
Acetyl3pro	MIGLAWLVSF	VLWAPAILFW	QYLVGERTVL	AGQCYIQFLS	QPIITFGTAM
Acetyl4pro	MIGLAWLVSF	VLWAPAILFW	QYLVGERTVL	AGQCYIQFLS	QPIITFGTAM
Acetyl2pro	MIGLAWLISF	ILWAPAILCW	QYLVGKRTVP	LDECQIQFLS	EPTITFGTAI
Acetyl5pro	MIGLAWLVSF	ILWAPAILCW	QYLVGKRTVP	PDECQIQFLS	EPTITFGTAI
Acetyl1pro	MIAAAWVLSF	ILWAPAILFW	QFIVGGRTVP	DKDCYIQFFS	NPAVTFGTAI

Résultats

	201				250
Acetyl3pro	AAFYLPVTVM	CTLYWRIYRE	TENRARELAA	LQGSETPGKG
Acetyl4pro	AAFYLPVTVM	CTLYWRIYRE	TENRARELAA	LQGSETPGKG
Acetyl2pro	AAFYIPVSVM	TILYCRIYRE	TEKRTKDLAD	LQGSDSVTKA	EKRKPAHRAL
Acetyl5pro	AAFYIPVSVM	TILYCRIYRE	TEKRTKDLAD	LQGSDSVAEA	KKREPAQRTL
Acetyl1pro	AAFYLPVIIM	TVLYWQISRA	SKSRIK....KG	KKEAAQNQDP
	251				300
Acetyl3proGGS	SSSSERSQPG	AEGSPETPPG	RCCRCCRAPR
Acetyl4proGGS	SSSSERSQPG	AEGSPESPPG	RCCRCCRAPR
Acetyl2pro	FRSCLRCPRP	TLAQRERNQA	SWSSRRRSTS	TTGKPSQATG	PSANWAKAEQ
Acetyl5pro	LRSFFSCPRP	SLAQRERNQA	SWSSRRRSTS	TTGKTTQATD	LSADWEKAEQ
Acetyl1pro	VSPSLVQGKI	VKPNNNNIPT	SSDGLHKNV	QNGKTT....GES
	301				350
Acetyl3pro	LLQAYSWKEE	EEEDEGSMES	L.....TSSE	GEEPGSE...
Acetyl4pro	LLQAYSWKEE	EEEDEGSMES	L.....TSSE	GEEPGSE...
Acetyl2pro	LTTCSSYPSS	EDEDKPATDP	VLQVVYKSQG	KESPGEEFSA	EETEETFVKA
Acetyl5pro	VTTCSSYPSS	EDEAKPTTDP	VFQMVYKSEA	KESPGKESNT	QETKETVVNT
Acetyl1pro	VMENCV...Q	GEEKDSSNDS	TSVSVVPSNT	KEDEAAK DAS	Q.....
	351				400
Acetyl3proVVI	KMPMVDPEAQ	APTKQPPRSS
Acetyl4proVVI	KMPMVDPEAQ	APTKQPPKSS
Acetyl2pro	ETEKSDYDTP	NYLLSPAAAH	RPKSQKCVAY	KFRLVVKADG	NQETNNGCHK
Acetyl5pro	RTENS DYDTP	KYFLSPAAAH	RLKSQKCVAY	KFRLVVKADG	TQETNNGCRK
Acetyl1proISASQD	HLKVENSKLT	CIRIVTKSQK	GDCCAPTNTT
	401				450
Acetyl3pro	PNTVKRP'KK	GRDRAGKGQK	PRGKEQLAKR	KTFSLVKEKK	AARTLSAILL
Acetyl4pro	PNTVKRP'KK	GRDRGGKGQK	PRGKEQLAKR	KTFSLVKEKK	AARTLSAILL
Acetyl2pro	VKIMPCFP'PV	AKEPSTKGLN	PNPSHQMTKR	KRVVLVKERK	AAQTLAILL
Acetyl5pro	VKIMPCSF'PV	SKDPSTKGPD	PNLSHQMTKR	KRMVLVKERK	AAQTLAILL
Acetyl1pro	VEIVGTNGDE	KQNSVARKIV	KMTKQPAKKK	PPPS..REKK	VTRTILAILL
	451				500
Acetyl3pro	AFILTWTPYN	IMVLVSTFCK	DCVPETLWEL	GYWLCYVNST	INPMCYALCN
Acetyl4pro	AFILTWTPYN	IMVLVSTFCK	DCVPETLWEL	GYWLCYVNST	VNPMCYASCN
Acetyl2pro	AFIITWTPYN	IMVLVSTFCD	KCVPVTLWHL	GYWLCYVNST	VNPICYALCN
Acetyl5pro	AFIITWTPYN	IMVLVSTFCD	KCVPVTLWHL	GYWLCYVNST	INPICYALCN
Acetyl1pro	AFIITWTPYN	VMVLINSFCA	SCIPGTVWTI	GYWLCYINST	INPACYALCN
	501			538	
Acetyl3pro	KAFRD'TFRLL	LLCRWDKRRW	RKIPKRPGSV	HRTPSRQC	
Acetyl4pro	KAFRDHF'RL	LLCRWDKRRW	RKIPKRPGSV	HRTPSRQC	
Acetyl2pro	RTFRKTFKML	LLCRWKKKKV	EEKLYWQGNS	KLP.....	
Acetyl5pro	RTFRKTFKLL	LLCRWKKKKV	EEKLYWQGNS	KLP.....	
Acetyl1pro	ATFKKTFKHL	LMCHYKNIGA	TR.....	

Résultats

Les amorces définies et utilisées (couleurs) sont :

Acetyl 3 : 5'-TAGATCTAGAAAYGCNWSNGTNATGAAY-3'

Acetyl 7 : 5'-ACTTAAGCTTNACRTARCANARCCARTA-3'

2.2. Tableaux des différentes PCR réalisées.

Les différentes amorces utilisées sont les Gprot 2,3,6 et 7b. Les multiples combinaisons sont :

{ G prot 2 : 5'-TAGATCTAGACYTGKCS5KBGCY GAYMT-3'

{ G prot 6 : 5'-ACTTAAGCTTAGGGCAGCCAGCAGAKSBYRAA-3'

{ G prot 2 : 5'-TAGATCTAGACYTGKCS5KBGCY GAYMT-3'

{ G prot 7b : 5'-ACTTAAGCTTGCARTARMHSA5RGGRTT3'

{ G prot 3 : 5'-TAGATCTAGACAT5RS5SYKGASMGSTRC-3'

{ G prot 6 : 5'-ACTTAAGCTTAGGGCAGCCAGCAGAKSBYRAA-3'

{ G prot 3 : 5'-YTCNGGNGCNARSTAYTCRTGNGTNCC-3'

{ G prot 7b : 5'-ACTTAAGCTTGCARTARMHSA5RGGRTT-3'

{ Adeno 3 : 5'-TAGATCTAGATAYATGGTNTAYTTYAAAYTTYTTY-3'

{ Adeno 7 : 5'-ACTTAAGCTTRTTCATNGCNSWRRTTNCC-3'

{ Acetyl 3 : 5'-TAGATCTAGAAAYGCNWSNGTNATGAAY-3'

{ Acetyl 7 : 5'-ACTTAAGCTTNACRTARCANARCCARTA-3'

Les conditions expérimentales de PCR sont les suivantes :

dénaturation à 95°C pendant 1 minute.

hybridation des amorces à 50°C pendant 1 minute.

élongation à 72°C pendant 1 minute.

ce cycle est répété 31x.

l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 minutes.

Cette programmation sera conservée tout au long du travail. La première amplification ne donnant rien, une deuxième amplification a été nécessaire. Nous avons également essayé différentes concentrations des amorces : 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM et 1 pM.

De nombreux gels ont été réalisés afin de savoir si l'amplification d'un fragment d'ADNc ou d'ADN génomique a pu avoir lieu (5 à 10 µl de chaque échantillon sont mis sur gel d'agarose 1%). La plupart des gels réalisés montrent qu'il n'y a eu aucune amplification ou bien qu'il y a eu de la RAPD (*random amplification polymorphic DNA*). La RAPD consiste en une amplification d'ADN à partir d'une seule amorce. Afin de ne pas confondre une amplification normale et la RAPD, de nombreux contrôles ont été effectués. Ces contrôles se font dans les mêmes conditions, mais avec une seule amorce. Les combinaisons d'amorces ayant donné un résultat figurent ci-dessous, tandis que les combinaisons ne présentant aucun résultat ne sont pas représentées.

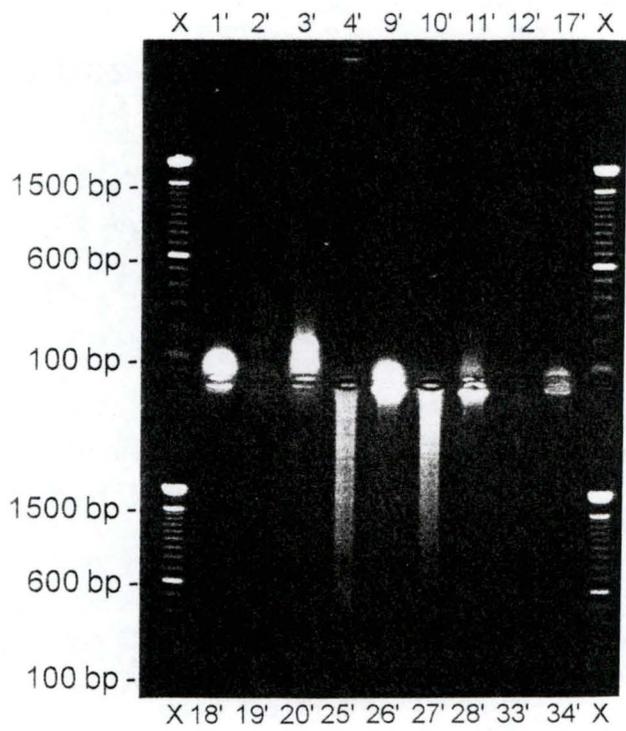


Fig. 19 : Deuxième PCR sur de l'ADN complémentaire de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b.
 X : marqueurs de taille.

Résultats

2.2.1. 2ème PCR sur l'ADNc de tabac avec les amorces G prot 2,3,6 et 7b.

Les premières PCR sur l'ADNc de tabac n'ayant rien donné, nous avons effectué une deuxième PCR sur les produits des premières amplifications.

Mix a'	Mix b'
120 µl tampon 10x	120 µl tampon 10x
48 µl dNTP 2,5 mM	48 µl dNTP 2,5 mM
840 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)	894 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)

Concentration des amorces 10 pM.

	25'	26'	27'	28'	Contrôles :	29'	30'	31'	32'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5
Mix a' (µl)	42	42	42	42	Mix b' (µl)	43	43	43	43
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq polymérase (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq polymérase (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

La figure 19 nous montre plusieurs pistes dont la 27'. Elle est caractérisée par une trainée. Ceci correspond à une amplification d'ADN de tailles différentes. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

2.2.2. 1ère PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces G prot 2,3,6 et 7b.

Mix a	Mix b
24 µl d'ADNc	24 µl d'ADNc
120 µl tampon 10x	120 µl tampon 10x
48 µl dNTP 2,5 mM	48 µl dNTP 2,5 mM
936 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)	936 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)

Concentration des amorces 100 pM.

	49	50	51	52	Contrôles :	53	54	55	56
Mix a (µl)	47	47	47	47	Mix b (µl)	48	48	48	48
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

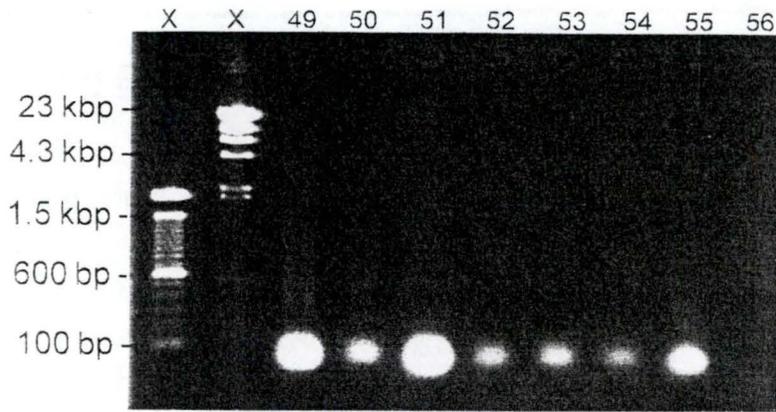


Fig. 20 : PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b. Concentration des amorces : 100 pM. Contrôles : pistes 53, 54, 55 et 56. X : marqueurs de taille.

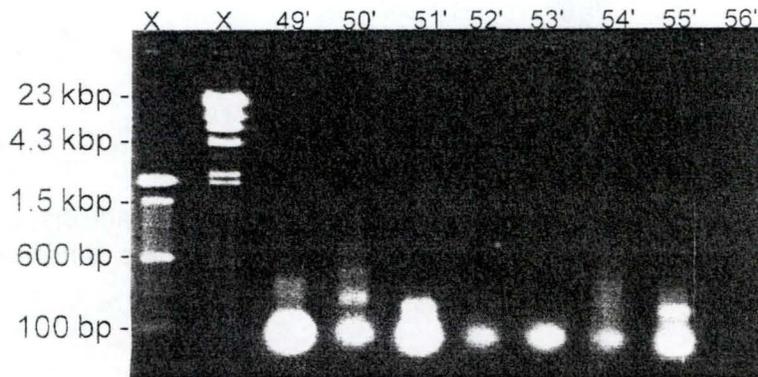


Fig. 21 : Deuxième PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b. Concentration des amorces : 100 pM. Contrôles : pistes 53', 54', 55' et 56'. X : marqueurs de taille.

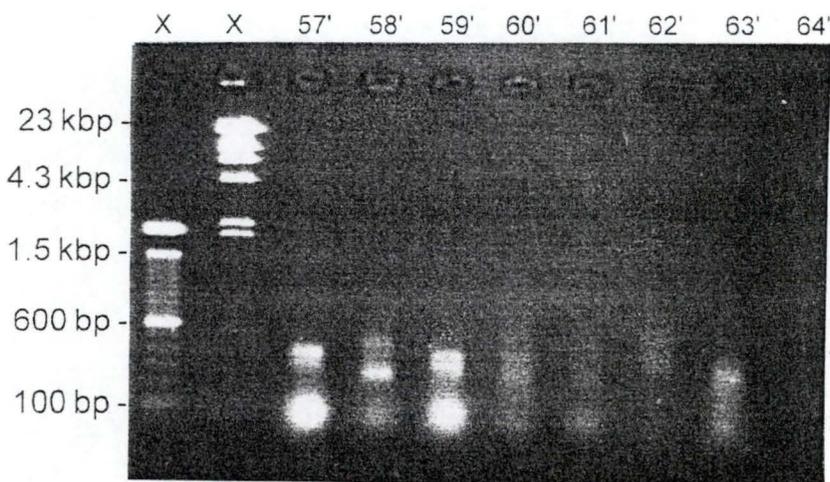


Fig. 22 : Deuxième PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b. Concentration des amorces : 50 pM. Contrôles : pistes 61', 62', 63' et 64'. X : marqueurs de taille.

Résultats

La figure 20 nous montre plusieurs pistes dont la 49 et la 50. Sur la piste 49, on peut apercevoir faiblement deux bandes. Sur la piste 50, on peut apercevoir faiblement trois bandes. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

2.2.3. 2ème PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces G prot 2,3,6 et 7b.

Mix a'	Mix b'
120 µl tampon 10x	120 µl tampon 10x
48 µl dNTP 2,5 mM	48 µl dNTP 2,5 mM
840 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)	894 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)

Concentration des amorces : 100 pM.

	49'	50'	51'	52'	Contrôles :	53'	54'	55'	56'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5
Mix a' (µl)	42	42	42	42	Mix b' (µl)	43	43	43	43
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

La figure 21 nous montre plusieurs pistes dont la 49' et la 50'. Sur la piste 49', on peut apercevoir deux bandes. Sur la piste 50', on peut également apercevoir deux bandes. Les bandes qui se trouvent dans les autres pistes sont de la RAPD. En effet ces bandes se retrouvent au niveau des contrôles. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

Concentration des amorces 50 pM.

	57'	58'	59'	60'	Contrôles :	61'	62'	63'	64'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5
Mix a' (µl)	42	42	42	42	Mix b' (µl)	43	43	43	43
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

La figure 22 nous montre plusieurs pistes dont la 58'. Sur cette piste, on peut apercevoir deux bandes. Les bandes qui se trouvent dans les autres pistes sont de la RAPD. En effet ces bandes se retrouvent au niveau des contrôles. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

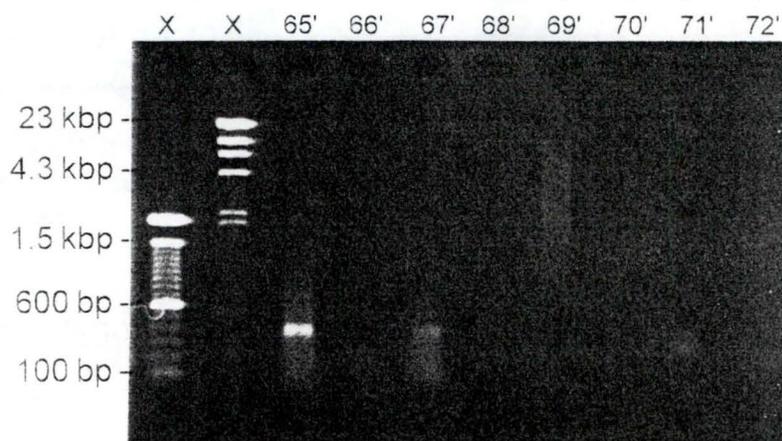


Fig. 23 : Deuxième PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b. Concentration des amorces : 20 pM. Contrôles : pistes 69', 70', 71' et 72'. X : marqueurs de taille.

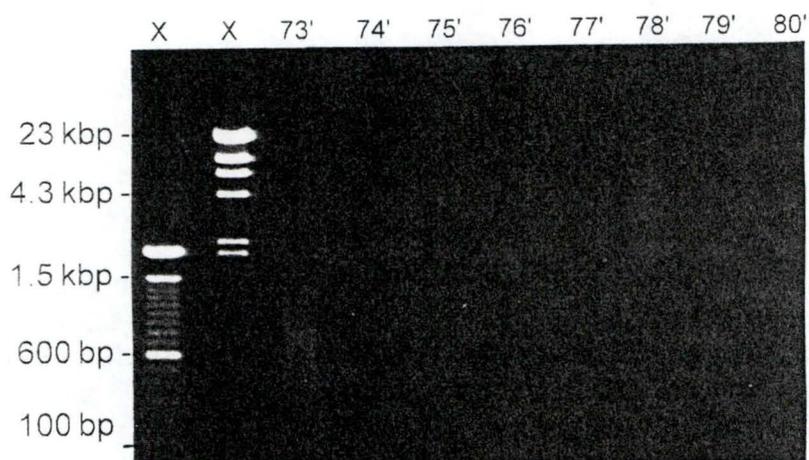


Fig. 24 : Deuxième PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b. concentration des amorces : 10 pM. Contrôles : pistes 77', 78', 79' et 80'. X : marqueurs de taille.

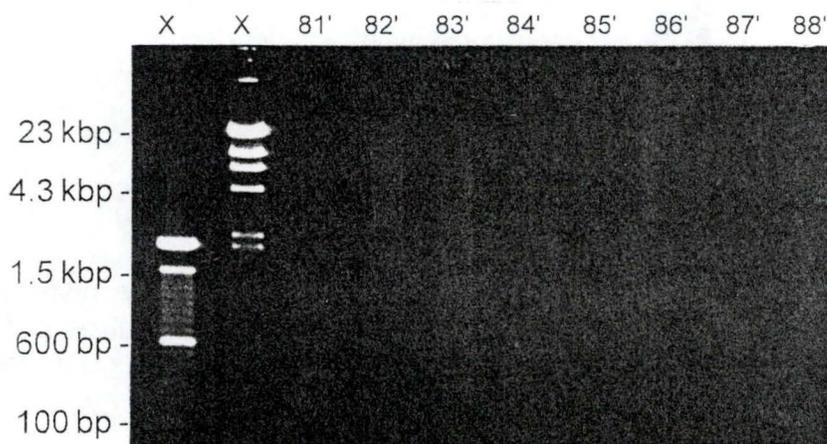


Fig. 25 : Deuxième PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Gprot 2,3,6 et 7b. concentration des amorces : 5 pM. Contrôles : pistes 85', 86', 87' et 88'. X : marqueurs de taille.

Résultats

Concentration des amorces 20 pM.

	65'	66'	67'	68'	Contrôles :	69'	70'	71'	72'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5
Mix a' (µl)	42	42	42	42	Mix b' (µl)	43	43	43	43
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

La figure 23 nous montre plusieurs pistes dont la 65' et la 67'. Sur la piste 65', on peut apercevoir nettement une bande. Sur la piste 67', on peut également apercevoir une bande. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

Concentration des amorces 10 pM.

	73'	74'	75'	76'	Contrôles :	77'	78'	79'	80'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5
Mix a' (µl)	42	42	42	42	Mix b' (µl)	43	43	43	43
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

La figure 24 nous montre plusieurs pistes dont la 73'. Sur la piste 73', on peut apercevoir deux bandes. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

Concentration des amorces 5 pM.

	81'	82'	83'	84'	Contrôles :	85'	86'	87'	88'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5	5	5
Mix a' (µl)	42	42	42	42	Mix b' (µl)	43	43	43	43
G prot 2 (µl)	1	1			G prot 2 (µl)	1			
G prot 3 (µl)			1	1	G prot 3 (µl)		1		
G prot 6 (µl)	1		1		G prot 6 (µl)			1	
G prot 7b (µl)		1		1	G prot 7b (µl)				1
Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1	1	1
Total (µl)	50	50	50	50	Total	50	50	50	50

La figure 25 nous montre plusieurs pistes dont la 81'. Sur la piste 81', on peut apercevoir une bande. Les pistes x et y correspondent à des marqueurs de taille.

Certaines combinaisons d'amorces correspondant aux pistes intéressantes se retrouvent à travers ces différents échantillons. Les différents échantillons provenant des PCR avec les amorces Gprot, sont regroupés en :

échantillon a (échantillons 49, 49', 65', 73', 81') possédant les amorces Gprot 2 et 6.

échantillon b (échantillons 50, 50', 58') possédant les amorces Gprot 2 et 7b.

échantillon c (échantillon 67') possédant les amorces Gprot 3 et 6.

échantillon d (échantillon 27' : trainée) possédant les amorces Gprot 3 et 6.

En ce qui concerne les PCR réalisées avec les amorces Adeno et Acetyl, nous n'avons pas pu observer de bande.

2.3. Clonage dans le vecteur SK⁺.

Les amorces intitulées Gprot possèdent un site de restriction dans leur séquence. Nous avons un site de restriction XbaI pour les amorces Gprot 6 et 7b :

5' -CCC GGG-3'

3' -GGG CCC-5'

Pour les amorces Gprot 2 et 3, nous avons un site de restriction HindIII :

5' -T CTAGA-3'

3' -AGATC T-5'

Chaque site de restriction est restreint afin que l'on puisse insérer le fragment amplifié par PCR dans le plasmide SK⁺. Ce plasmide possède dans son site multiple de clonage notamment les deux sites de restriction correspondant aux amorces Gprot. Ceux-ci vont être également restreints.

Pour que la ligation avec le plasmide se déroule dans des conditions optimales, il doit être déphosphorylé. En effet en déphosphorylant le plasmide, on l'empêche de se refermer sur lui-même puisque la liaison se fait par un groupement phosphate.

2.3.1. Mise au point du rapport Insert/SK⁺ pour la ligation.

De nombreux rapports ont été essayés afin d'avoir des conditions optimales de ligation entre les inserts (échantillons a, b, c et d) et SK⁺. Le rapport de ligation qui sera retenu est de 1/5.

2.3.2. Contrôles.

La ligation de SK⁺ avec les fragments PCR est réalisée dans un volume de 20 µl à 16°C pendant une nuit sous l'action de la ligase. Ces conditions expérimentales vont être respectées au cours des différentes ligations. Dès que le clone est obtenu, il va être introduit dans des cellules électrocompétentes par électroporation. Pour vérifier si la transformation a bien eu lieu, on étale les cellules sur boîtes de Pétri (LB + agar + ampicilline + tétracycline + IPTG + X-

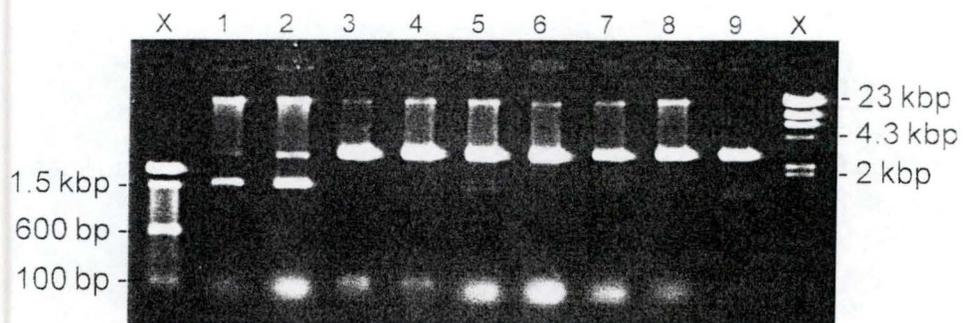


Fig. 26 : Restriction avec les enzymes XbaI et HindIII.

GAL). En effet, les cellules sont résistantes à la tétracycline, la transformation par le plasmide apportant la résistance à l'ampicilline.

Un contrôle supplémentaire est nécessaire afin de vérifier si l'insert se trouve bien dans le plasmide. Le test blanc/bleu consiste à observer les colonies obtenues sur boîte de Pétri. L'IPTG va induire les colonies bactériennes à synthétiser la β -galactosidase. Cette enzyme va dégrader le X-GAL (galactose) et donner une coloration bleue aux colonies. Si le clonage a bien eu lieu, l'insert est mis dans le site multiple de clonage, dans la séquence codant pour la β -galactosidase. Le gène ne pourra plus être exprimé et le galactose ne sera plus dégradé. Les colonies seront blanches.

2.3.3. Sélection des clones intéressants.

Les colonies blanches sont sélectionnées et mise en culture. Les plasmides en sont extraits. Cela nous permet de vérifier une fois de plus si l'insert se trouve bien dans le plasmide et si celui-ci est présent.

Afin de réaliser cette vérification, une double restriction est réalisée sur un échantillon. Les enzymes de restriction choisies correspondent à celles qui nous ont permis de réaliser la ligation. Ces enzymes de restriction sont : XbaI et HindIII. Ensuite, les échantillons sont mis sur gel d'agarose 1%.

La figure 26 montre les restrictions effectuées sur les clones. Les pistes correspondent aux extractions des plasmides de différentes colonies blanches. Dans chaque piste, on retrouve 3 bandes. La première (23 kbp), représente de l'ADN génomique. Les 2 autres bandes représentent d'une part le plasmide restreint et d'autre part une forme surenroulée du plasmide que l'on ne peut restreindre (1300 bp). Dans les pistes 3 et 4 à 100 bp se trouve une autre bande, probablement l'insert. Celui-ci provient de la combinaison des amorces Gprot 2 et 7.

Grâce à cette double restriction, deux échantillons sont sélectionnés et vont pouvoir être séquencés.

2.4. Séquençage : 2 séquences hypothétiques.

Après révélation du gel de séquençage, voici les séquences qui en découlent :

2.4.1. Clone RCPG 1.

```
1 gagtatgcta ttaagtggcg tgaacaggcg tcgagagtga agcctcccat
51 ggatgaagtg ggaaatggtc actacctttc tccaggctca agagtctgac
101 tatttccaaa acatgatgtc agcaccggcc aag
```

2.4.2. Clone RCPG 2.

```
1 gagttgaagc ccgagaacgt caaaattcta atttcgcca ttcaagccca
51 aatctactct gtacctccaa aacacattct gatcacactc ctaagtcttg
101 aatcacctcc tgaggctatc cgaacaatcg g
```

2.5. Analyse des banques de données.

2.5.1. Clone RCPG 1.

Les séquences nucléotidiques qui suivent ont été recherchées au moyen de la fonction *FASTA* du programme *GCG* dans la banque *GenEMBL*. Les séquences sont reprises par ordre d'apparition lors de la recherche correspondant donc à des homologies décroissantes.

Liste des 40 meilleures séquences homologues trouvées au moyen de la fonction *FASTA* du programme *GCG*.

```
Gb_Pr:Hsthyrr X05615 Human mRNA for thyroglobulin. 11/92
Gb_Pl:Scchriiii /rev X59720 S.cerevisiae chromosome III c...
Gb_In:Celr01h2 U00035 Caenorhabditis elegans cosmid R01H...
Gb_Pl:Chntxx Z00044 Tobacco chloroplast genome DNA. 12/93..
Gb_Pr:Humprok /rev L00727 Homo sapiens (clone 231G8) myo...
Gb_Ba:Ecouw93 /rev U14003 Escherichia coli K-12 chromoso...
Gb_Pr:Hstcrbv U03115 Human V beta T-cell receptor (TCRBV...
Gb_Pl:Chntxx /rev Z00044 Tobacco chloroplast genome DNA...
Gb_Pr:Humpadprpz /rev L14752 Homo sapiens poly(ADP-ribos...
Gb_Ba:Ecouw76 U00039 E. coli chromosomal region from 76....
Gb_Pr:Humepohydd L29766 Homo sapiens epoxide hydrolase (...
Gb_Pr:Humtcrb L36092 Homo sapiens (clones: K41A, K35, K2...
Gb_Pr:Humtcrb-2 Continuation of HUMTCRB from base 350001...
Gb_In:Cec28a5 Z32680 Caenorhabditis elegans cosmid C28A5...
Gb_In:Cef55h2 /rev Z27080 Caenorhabditis elegans cosmid ...
Gb_Pr:Humhcf2 M58600 Human heparin cofactor II (HCF2) ge...
Gb_Ro:Ratefcvfgm L14684 Rattus norvegicus nuclear-encode...
Gb_Pr:Hsablg2 /rev U07562 Human ABL gene, intron 1b, pa...
Gb_Ro:Mushprtpr /rev M12561 Mouse X-chromosome linked HP...
Gb_Pr:Humdystrop /rev M86524 Human dystrophin gene. 4/92
Gb_Ba:Ecouw76 /rev U00039 E. coli chromosomal region fro...
Gb_Ro:Mushprt1 /rev K01507 Mouse hypoxanthine phosphorib...
Gb_Pl:S53418 /rev S53418 MYO2 homolog...ribosomal protei...
Gb_In:Celc05d11 U00048 Caenorhabditis elegans cosmid C05...
Gb_Pl:Ysch9998 /rev U00030 Saccharomyces cerevisiae chro...
Gb_Ph:Pmufgi M74911 Bacteriophage mu F protein (3' end),...
Gb_Pl:Sctyl17x X03840 Yeast transposon Tyl-17 and flanki...
Gb_Pr:Humtcrb-2 /rev Continuation of HUMTCRB from base 3...
Gb_Ba:U00016 U00016 Mycobacterium leprae cosmid B1937. 3/94
Gb_Vi:Helcg /rev X14112 Herpes simplex virus (HSV) type ...
Gb_Pl:Scmel6 /rev Z37510 S.cerevisiae gene for alpha-gal...
Gb_Pr:Hsac01 /rev V00478 Human mRNA fragment encoding cy...
Gb_Ro:Mus25rnase /rev L10382 Mus musculus 2-5A-dependent...
```

Résultats

Gb_Pl:Chosxx /rev X15901 Rice complete chloroplast genom...
Gb_Pr:Humfixg /rev K02402 Human factor IX gene, complete...
Gb_Pr:Hsac07 /rev X00351 Human mRNA for beta-actin. 6/85
Gb_Pl:Tomrbco D11112 Tomato ribulose 1,5-bisphosphate ca...
Gb_Pr:Humaccybb /rev M10277 Human cytoplasmic beta-actin...
Gb_Pr:Hsactb /rev X63432 H.sapiens ACTB mRNA for mutant ...
Gb_Pl:Scgall /rev X76078 S.cerevisiae (alphaS288C) GAL1,...

La séquence présentant la plus grande homologie avec notre séquence correspond à l'ARN messager de la thyroglobuline.

2.5.2. Clone RCPG 2.

Par le même procédé que pour le clone1, voici les séquences nucléotidiques que nous avons obtenues :

Liste des 40 meilleures séquences homologues trouvées au moyen de la fonction FASTA du programme GCG.

Gb_Pl:Scchriii X59720 S.cerevisiae chromosome III comple...
Gb_Pr:Humvwfaa /rev M60675 Human von Willebrand factor g...
Gb_Pr:Humvwfab /rev M60676 Human von Willebrand factor p...
Gb_In:Celb0280 U10438 Caenorhabditis elegans cosmid B028...
Gb_Pr:Humtcrb-2 /rev Continuation of HUMTCRB from base 3...
Gb_Pl:Scchriii /rev X59720 S.cerevisiae chromosome III c...
Gb_Ba:Ecouw82 L10328 E. coli genomic region from 81.5 to...
Gb_Pr:Hsablgr3 /rev U07563 Human proto-oncogene tyrosine...
Gb_Pl:Scchriifg Z21487 S.cerevisiae RIM, MS11, PGI, and ...
Gb_Pr:Humneurof /rev L05367 Human oligodendrocyte myelin...
Gb_In:Cef45h7 /rev Z34800 Caenorhabditis elegans cosmid ...
Gb_Pr:Humtcrb-2 Continuation of HUMTCRB from base 350001...
Gb_Pl:Ysch9998 /rev U00030 Saccharomyces cerevisiae chro...
Gb_Ba:Ecouw82 /rev L10328 E. coli genomic region from 81...
Gb_Pl:Scthr4 X17256 Yeast THR4 gene for threonine syntha...
Gb_In:Aplkchannl /rev M95914 Aplysia californica potassi...
Gb_In:Cec07a9 /rev Z29094 Caenorhabditis elegans cosmids...
Gb_Ba:Bac180k D26185 B. subtilis DNA, 180 kilobase regio...
Gb_In:Celt22f7 /rev U13071 Caenorhabditis elegans cosmid...
Gb_Pl:Sc22kbf X78214 S.cerevisiae (aS288C) 22.4kb DNA fr...
Gb_Ba:Ecgadbg X71917 E.coli cds102, cds 103, cds106, cds...
Gb_Pr:Hummhrplb /rev L26261 Human MHC class III HLA-RP1 ...
Gb_Ba:Anazvd /rev D26095 Anabaena sp. gene for zeta-car...
Gb_Pl:Yscrad2g /rev M10275 S.cerevisiae RAD2 gene encodi...
Gb_Pl:Scracii X78993 S.cerevisiae genomic DNA 70kb regio...
Gb_Pl:Yscsygp2 L10830 Saccharomyces cerevisiae chromosom...
Gb_In:Cet05g5 /rev Z27079 Caenorhabditis elegans cosmid ...
Gb_Pl:Scrl732 /rev X64101 S.cereale DNA for dispersed re...
Gb_In:Cec30d11 Z35596 Caenorhabditis elegans cosmid C30D...
Gb_Pl:Ysch9433 U11582 Saccharomyces cerevisiae chromosom...
Gb_Pr:Humretblas L11910 Human retinoblastoma susceptibil...
Gb_Pl:Pincptrpg D17510 Complete sequence of black pine (...
Gb_In:Cec48d5 /rev Z36237 Caenorhabditis elegans cosmid ...
Gb_Pl:Scul2027 U12027 Saccharomyces cerevisiae suppresso...
Em_In:S49463 /rev S49463 unc-6=laminin-related protein [...

Résultats

Gb_Ov:Ggfiaact X13875 Chicken mRNA for fibroblast alpha-...
Gb_Ov:Chkacta J03486 Chicken actinin mRNA, complete cds....
Gb_Ov:Chkacna J02666 Chicken alpha-actinin mRNA, partial...
Gb_Ro:Mmconreg /rev Z13985 M.musculus control region seq...
Gb_In:Celunc6a /rev M80241 Caenorhabditis elegans unc-6 ...

Quand à la deuxième séquence que nous avons obtenues, elle correspond à une séquence provenant du chromosome III de *S.cerevisiae*.

3. Clonage de kinases chez les végétaux supérieurs.

3.1. Rappel bibliographique.

De nombreuses kinases sont présentes chez les cellules végétales (PKC-like, Receptor-like kinase, CDPK, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, Phospholipidinositol kinase,...). Elles interviennent à différents niveaux dans les voies de transduction du signal. Elles transmettent le signal perçu au niveau de la membrane, jusqu'au noyau afin d'induire les réponses cellulaires adéquates. Les kinases possèdent un site catalytique. Ce site peut phosphoryler des résidus sérine et thréonine. Aucune kinase phosphorylant un résidu tyrosine n'a été mise en évidence jusqu'à présent. C'est cette phosphorylation qui constitue la transmission du signal d'une protéine à une autre.

3.2. Stratégie de clonage.

Différentes séquences en acides aminés de kinases végétales connues ont été alignées (fonction *Pileup* de GCG) dans le but de définir des amorces PCR utilisables pour l'identification de kinases chez le tabac et la carotte, deux modèles expérimentaux communément utilisés au laboratoire.

Seq1 : Sérine/thréonine protéine kinase de *Pisum sativum*
Seq2 : Protéine kinase G11A d'*Oryza sativa*
Seq3 : Protéine kinase dépendante de second messenger de *Zea mays*
Seq4 : Protéine kinase d'*Arabidopsis thaliana*
Seq5 : Protéine kinase PVPK-1 de *Phaseolus vulgaris*
Seq6 : Sérine/thréonine protéine kinase d'*Arabidopsis thaliana*
Seq8 : Sérine/thréonine protéine kinase Atpk7 d'*Arabidopsis thaliana*
Seq9 : Protéine kinase de *Mesembryanthemum cristallinum*
Seq10 : Sérine/thréonine protéine kinase de *Neurospora crassa*
Seq11 : Sérine/thréonine protéine kinase de *Saccharomyces cerevisiae*

	1					50
Seq3
Seq6MAS
Seq2
Seq4
Seq5	MESSVNGVDS	LSEVQNSVSG	VHHHDPLPSG	TPQPSRPPLR	ASRNYDGGHQ	
Seq9
Seq8MDSSES

Résultats

```

Seq1 .....
Seq10 .....MDNT NRPHLNLGTN DTRMAPNDRT YPTTPSTFPQ
Seq11 .....MASLFR PPESAKCNP SPRLKLP LLR
51 100

Seq3 .....
Seq6 TRKPSGHGAE VEAQKRSSSN SSTKSAKAET FEPMQLORSV TNPRAVGIPE
Seq2 .....EVVQ
Seq4 .....
Seq5 TKAIHHHNSH VINQKHSHQE GKTLKQEGLP TKLSSKQPPL DDSKGCEPNG
Seq9 .....
Seq8 VVYVGSSSKS RNFQSKSKGS ITSFSIDSRG TKKSMKLLI PEPEPTSPEV
Seq1 .....
Seq10 PVFPGQQAGG SQQYNQAYAQ SGNYYQONHN DPNTGLAHQF AHQONIGSAGS
Seq11 NNQVDENNIY LTSNGSSTTA YSSHTPEPLT SSTSTLFSQT RLHPSDSSMT
101 150

Seq3 .....
Seq6 SKRLPESFRK RSSDPAVCKP DFSSLSTVLE HVDSL TIDEK KTSFGFSVKT
Seq2 KEQKSTQHQN ESIDL TGSND PAEVKAEGNL VPKRLADEEK GVVEDGIANG
Seq4 .....MMASKTPEGS LTNSSQSMSI
Seq5 VLESEKRRVV DNHGKNYSQP DATFCASPQN SFYSATVYSE AKESFTNTEV
Seq9 .....
Seq8 IESSVSSVSA ESETPISIIR KKKQSEPRFY SSPTNTFYTE AKQSFTNTEF
Seq1 .....
Seq10 ASPYGSRGPS PAQRPRTS GN SGQQQTYGNY LSAPMPSNTQ TEFAPLP SGT
Seq11 LNTMKKR PAP PSLP SLSINS QSKCKTLPEL VPIADVSDGK HDLGLKQRVI
151 200

Seq3 .....
Seq6 SSASAKLSDG TSSLGKTS GS AKLSGRLDFM ESG.KSSICR G...STSSDV
Seq2 SLKSSSALGK EHGIASASGS ARLVGRSETG ERGFSSSRCR P...STSSDV
Seq4 NTLADQVSSS LSFADPSSDG KTGNSKINEQ GESGKSSTCR P...STSSDI
Seq5 SECASVDKSC ESEVANSSD. ....F NESRKTSICR A...STGSDA
Seq9 .....
Seq8 SECASISTIG IGGIDLEKNG VM.....IYR G...SIGSDV
Seq1 .....
Seq10 PTNMAPMPTT TSSSAHSWPL TSLSTASSAP GSATSGECCS DALLPLHPAV
Seq11 AENELSGNSD LTPSSMASPF SHTNTSSPYL RNDLSN....SVGSDF
201 250

Seq3 .....KPHKS. NDSKWEAIQV VRTKEG.SV. ....GLG
Seq6 SDESSCSSFS STVNKPKHA. NDLRWEAIQA VRVRDG.LL. ....GLS
Seq2 SDESACSSIS S.VTKPKHA. NDSRWEAIQM IRTRDG.IL. ....GLS
Seq4 SDESTCSSFS SSINKPKHA. NDVRWEAIQA VRTKHG.GL. ....GLN
Seq5 SDESSTSSLS SVLYKPKHA. NDIRWEAIQA VRTRDG.ML. ....EMR
Seq9 .....
Seq8 SDESSSSGLS NAAYKPHRDN NDKRWVAIQE VRSRVGSSL. ....EAK
Seq1 .....
Seq10 IGADTLFSQS EMEQKLGETN DARRRESIWS TAGRKEGQYL RFLSTKDKPE
Seq11 SNLISAYEQS SSPIKSSSQP KSSSESYIDL NSVRDVDQLD ENGWKYANLK

```

Résultats

	251				300
Seq3	H.FRLLKRLG	CGDIGSVYLS	ELSGTKCYFA	MKIMD..KAS	LASRKKLLRA
Seq6	H.FRLLKRLG	CGDIGSVYLS	ELSGTKCYFA	MKVMD..KTS	LASRKKLLRA
Seq2	H.FKLLKRLG	CGDIGSVYLS	ELSGTESYFA	MKVMD..KAS	LASRKKLLRA
Seq4	H.FRLLKRLG	CGDIGTVHLA	ELNGTRCYFA	MKVMD..KTA	LASRKKLLRA
Seq5	H.FRLLKRLG	CGDIGSVYLA	ELSGTRTSFA	MKVMN..KTE	LANRKKLLRA
Seq9EF	LARRKKISRA
Seq8	D.FKLIKRLG	GGDIGNVYLA	ELIGTVGSFA	VKVME..KAA	IAARKKLVRA
Seq1
Seq10	N.YQTIKIIG	KGAFGEVKLV	QKKADGKVYA	MKSLI..KTE	MFKKQQLAHV
Seq11	DRIETLGILG	EGAGGSVSKC	KLKNGSKIFA	LKVINTLNTD	PEYQKQIFR.

	301				350
Seq3	QTEREILQCL	DHPFLPTLYT	HFETDKFS..	CLVMEFCPGG	DLHTLRQK..
Seq6	QTEREILQSL	DHPFLPTLYT	HFETEKFS..	CLVMEFCPGG	DLHTLRQR..
Seq2	QTEKEILQCL	DHPFLPTLYT	HFETDKFS..	CLVMEFCPGG	DLHTLRQR..
Seq4	QTEREILQCL	DHPFLPTLYS	HFETEKFS..	CLVMEFCPGG	DLHTLRQR..
Seq5	QTEREILQSL	DHPFLPTLYT	HFETEIFS..	CLVMEFCPGG	DLHALRQR..
Seq9	QTETQILRML	DHPFLPTLYC	QFTSDNLS..	CLVMEYCPGG	DLHVLQR..
Seq8	QTEKEILQSL	DHPFLPTLYS	HFETEMNS..	CLVMEFCPGG	DLHSLRQK..
Seq1
Seq10	RAESDILAES	DSPWVVKLYT	TFQDANFL..	YMLMEFLPGG	DLMTMLIK..
Seq11	..ELQFNRSF	QSEYIVRYYG	MFTDDENSSI	YIAMEYMGR	SLDAIYKNLL

	351				400
Seq3	QPGKYFPEQA	AKFYVAEVLL	ALEYLHMLGI	IYRDLKPENV	LVRDGHIML
Seq6	QPGKHFSEQA	VKFYIAESLL	ALEYLHMLGI	VYRDLKPENV	LVRDGHIML
Seq2	QRGKYFPEQA	VKFYVAEILL	AMEYLHMLGI	IYRDLKPENV	LVRDGHIML
Seq4	QPGKRFTEQA	AKFYVAEVLL	AMEYLHMLGI	IYRDLKPENV	LVRDDRHVML
Seq5	QPGKYFSEHA	VRFYVAEVLL	SLEYLHMLGI	IYRDLKPENV	LVRDGHIML
Seq9	QPGRCFTEQA	ARFYLAEVLL	ALEYLHMLGV	VYRDLKPENI	LVRDGHIML
Seq8	QRGKYFPEQA	ARFYVAEVLL	AMEYLHMLGI	IYRDLKPENV	LVRDGHIML
Seq1DLKPENV	LIQSNGHVSL
Seq10	Y..EIFSEDI	TRFYIAEIVL	AIDAVHKLGF	IHSDIKPDNI	LLDSGGHVKL
Seq11	ERGGRISEKV	LGKIAEAVLR	GLSYLHEKKV	IHRDIKPQNI	LLNENGQVKL

	401				450
Seq3	SDFDLSLRCA	VSPTLLRSSN	PSGDNQKG.N	PAY...CVQP	VCIEPAC.MQ
Seq6	SDFDLSLRCL	VSPTLVKSAA	IESDPLRK.N	.VY...CVQP	ACIEPSC.IQ
Seq2	SDFDLSLRCA	VSPTLIRSSN	PDAEALRKNN	QAY...CVQP	ACVEPSCMIQ
Seq4	SDFDLSLRCT	VSLSIVRSAN	VGSEGLSKNS	VSC...SQQP	ACIQQPSCI.
Seq5	SDFDLSLRCS	VSPTLVKSSNNLQTKS	SGY...CVQP	SCIEPTCVMQ
Seq9	SDFDLSLRCA	VSPTLLVSSS	MSATSKKMSG	PCVDSRCVQP	LCIQPSCQV.
Seq8	SDFDLSLRCA	VSPTLVRFVA	ITLESKSSS.YCIQP	TCVDQSSCIV
Seq1	TDFDLS....
Seq10	TDFGLS....	TGFHKLHDNN
Seq11	CDFGVSGEAV	NS.....

	451				500
Seq3	PSCVTTTTTCF	SPRFFSSKSK	EKKDKKAKA.	.DWAN.QVRP	LPELVAEPTD
Seq6	PSCTVPTTCF	SPRLFSSKS.	.KKDRKPKN.	.DTAN.QVRP	LPELVAEPTD

Résultats

Seq2 PSCATPTTCF GPRFF...SK SKKDRKPKP. .EVVN.QVSP WPELIAEPSD
 Seq4 ..SMAPTSCF GPRFFSSKS. .KKDKPKPT. .ENGNHQVTP LPPELVAEPTG
 Seq5 PDCIKP.SCF TPRFLSGKSK KDKKSKPKN. .DMHN.QVTP LPELIAEPTN
 Seq9TCF TPRLLASSSK LRKMK..... ...SDLEMKP LLQLVAEHTD
 Seq8 QPDCIQPVCF TPRFLS.... .KGKHRKKS. .NDMSRQIRP LPELIAEPTS
 Seq1CLTSC KPQLILPAIE EKKKRKSKK. .NKGQKNQO VPMFMAEPMR
 Seq10Y YTQLLQKSN KPRDNRNSVA IDQINLTVSN RAQINDWSRS
 Seq11

501

550

Seq3 AK..SMSFVG **THEYLAPE**II KEGHGSAVD WWTFGIFLYE LLFGKTPFKG
 Seq6 AR..SMSFVG **THEYLAPE**II KEGHGSAVD WWTFGIFLYE LLFGRTPFKG
 Seq2 AR..SMSFVG **THEYLAPE**II KEGHGSAVD WWTFGIFLYE LLFGKTPFKG
 Seq4 AR..SMSFVG **THEYLAPE**II KEGHGSAVD WWTFGIFLYE LLFGKTPFKG
 Seq5 AR..SMSFVG **THEYLAPE**II KEGHGSAVD WWTFGIFLYE LLFGRTPFKG
 Seq9 AML.TNSFVG **THEYLAPE**IY KEGHGSAVD WWTFGISSTS FYMENSPLKE
 Seq8 AR..SMSFVG **THEYLAPE**II KEGHGSAVD WWTFGIFLYE LLFGITPFRG
 Seq1 A...SNSFVG **THEYLAPE**..
 Seq10 SRLMAYSTVG **TPDYLAPE**IF TGHGYSFDCD WWSLGTIMFE CLVGWPPFCA
 Seq11 ...LATTFTG **TSFYMAPERI** QGQPYSVTSD VWSLGLTILE VANGKFPCCS

551

600

Seq3 SGNRATLFNV V..GQPLRF. PESPVVSFAA RDLIRGLLIK EPQHRLAYKR
 Seq6 SGNRQTLFNV V..GQPLRF. PETPVVSFAA RDLIRGLLMK EPQORLGFKR
 Seq2 SGNRATLFNV I..GQPLRF. PEYPVVSFSA RDLIRGLLVK EPQORLGCKR
 Seq4 SGNRATLFNV V..GQPLRF. PESPVVSFAA RDLIRSLLVK EPQHRLAYKR
 Seq5 SANRATLFNV I..GQPLRF. PESPTVSFAA RDLIRGLLVK EPQHRLAYRR
 Seq9 GNDRT.....
 Seq8 GDNRATLFNV V..GQPLRF. PEHPNVSFAA RDLIRGLLVK EPQHRLAYRR
 Seq1
 Seq10 EDSHDTYRKI VNWSHSLYF. PDDITLGVDA ENLISSLIC. NTENRLG.RG
 Seq11 EKMAANIAPF ELLMWILTFT PELKDEPESN IDSREGQMKK NVNEKFKCWK

601

650

Seq3 GATEIKQHPF FEGVNWALIR CATPPDIPKP VEIPRSV... ..ASSSQ...
 Seq6 GATEVKQHPF FEGVNWALIR CATPPEIPKP VELEKGAVSV AEAPSSQ...
 Seq2 GATEIKQHPF FEGVNWALIR CASPPEVPRP VEIERPP... KQPVSTS...
 Seq4 GATEIKQHPF FEGVNWALVR CASPPEIPKP VIL..... KLLNPTP...
 Seq5 GATEIKQHPF FQNVNWALIR CATPPEVPRQ VI.....
 Seq9
 Seq8 GATEIKQHPF FQSVNWALIR CTSPPOIPQP VKPMDQAHSV RHGFSQG...
 Seq1
 Seq10 GAHEIKSHAF FRGVEFDSL RIRAPFEPRL TSAIDTTYFP TDEIDQTDNA
 Seq11

651

691

Seq3 ...KATSA... ..AEKGS D.YLELEFF.
 Seq6 ...KTAAG... .LVLNAQKGS DNYLEFDFF.
 Seq2 ...EPAAA... .PSDAAQKSS DSYL.....
 Seq4 ...TVPAA... .ASSSVRSQ SNYLEFDFF.
 Seq5 ...NLPQT... .EKDLGVKPS GNYLDIDFF.



Fig. 27 : Deuxième PCR sur de l'ADN complémentaire de tabac avec les amorces Kin R et G. Concentration des amorces : 100 pM. Contrôles : pistes 158', 159', 55'. Concentration des amorces : 50 pM. Contrôles : pistes 161' et 162'. X : marqueurs de taille.

Résultats

```

Seq9 .....
Seq8 ...HGHVGYD KPPTVDVKPS GNYLEIDFF. ....
Seq1 .....
Seq10 TLLKAQQAAS GAAAPAQQEE SPELSLPPFIG YTFKRFDNNF R
Seq11 .....
  
```

Les amorces ainsi définies (en couleurs) sont :

KIN R : 5'-YTCNGGNGCNARSTAYTCRTGNGTNCC-3'

KIN G : 5'-GAYYTNAARCCNGARAAYGT-3'

3.3. Tableaux des différentes PCR réalisées.

Il n'y a qu'une seule combinaison d'amorces possible :

[KIN R : 5'-YTCNGGNGCNARSTAYTCRTGNGTNCC-3'

[KIN G : 5'-GAYYTNAARCCNGARAAYGT-3'

Les conditions expérimentales sont les mêmes qu'au point 2.2.

3.3.1. 2ème PCR sur l'ADN de tabac avec les amorces KIN R et G.

Mix e'	Mix f'
25 µl tampon 10x	50 µl tampon 10x
10 µl dNTP 2,5 mM	20 µl dNTP 2,5 mM
175 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)	210 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)

Concentration des amorces 100 pM.

	157'	Contrôles	158'	159'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5
Mix e' (µl)	42	Mix f' (µl)	43	43
KIN R (µl)	1	KIN R (µl)	1	
KIN G (µl)	1	KIN G (µl)		1
Taq pol. (µl)	1	Taq pol. (µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

La figure 27 nous montre plusieurs pistes dont la 157'. Sur cette piste, on peut apercevoir une bande. La bande qui se trouve dans la piste (contrôle) 158' est de la RAPD. Mais heureusement, elle ne correspond pas à celle qui se trouve dans la piste 157'. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.



Fig. 28 : PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Kin R et G. Concentration des amorces : 100 pM. Contrôles : pistes 173 et 174. Concentration des amorces : 50 pM. Contrôles : pistes 176 et 177. X : marqueurs de taille.

Résultats

Concentration des amorces 50 pM.

	160'	Contrôles	161'	162'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5
Mix e' (µl)	42	Mix f' (µl)	43	43
KIN R (µl)	1	KIN R (µl)	1	
KIN G (µl)	1	KIN G (µl)		1
Taq pol. (µl)	1	Taq pol. (µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

La figure 27 nous montre plusieurs pistes dont la 160'. Sur cette piste, on peut apercevoir une bande. En se référant à la piste 157', on remarque qu'elles sont au même niveau (350 bp). Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

3.3.2. 1ère PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces KIN R et G.

Mix e	Mix f
5 µl d'ADNc	10 µl d'ADNc
25 µl tampon 10x	50 µl tampon 10x
10 µl dNTP 2,5 mM	20 µl dNTP 2,5 mM
195 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)	390 µl d'eau (<i>RNAase free</i>)

Concentration des amorces : 100 pM.

	172	Contrôles :	173	174
Mix e (µl)	47	Mix f (µl)	48	48
Kin R (µl)	1	Kin R (µl)	1	
Kin G (µl)	1	Kin G (µl)		1
Taq pol. (1 u/µl)	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

Concentration des amorces 50 pM.

	175	Contrôles :	176	177
Mix e (µl)	47	Mix f (µl)	48	48
Kin R (µl)	1	Kin R (µl)	1	
Kin G (µl)	1	Kin G (µl)		1
Taq pol. (1 u/µl)	1	Taq pol. (1 u/µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

La figure 28 nous montre plusieurs pistes dont les plus intéressantes sont la 172 et la piste 175. On peut apercevoir notamment une bande à 350 bp. Les autres bandes correspondent à de la RAPD si on se réfère aux contrôles et notamment à celui de la piste 173. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.



Fig. 29 : Deuxième PCR sur de l'ADN génomique de tabac avec les amorces Kin R et G. Concentration des amorces : 100 pM. Contrôles : pistes 173' et 174'. Concentration des amorces : 50 pM. Contrôles : pistes 176' et 177'. Concentration des amorces 20 pM. Contrôles : pistes 179' et 180'. X : marqueurs de taille.

Résultats

3.3.3. 2ème PCR sur l'ADN génomique de tabac avec les amorces KIN R et G.

Mix e'	Mix f'
25 µl tampon 10x	50 µl tampon 10x
10 µl dNTP 2,5 mM	20 µl dNTP 2,5 mM
175 µl d'eau (RNAase free)	210 µl d'eau (RNAase free)

Concentration des amorces 100 pM.

	172'	Contrôles	173'	174'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5
Mix e' (µl)	42	Mix f' (µl)	43	43
KIN R (µl)	1	KIN R (µl)	1	
KIN G (µl)	1	KIN G (µl)		1
Taq pol. (µl)	1	Taq pol. (µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

Concentration des amorces 50 pM.

	175'	Contrôles	176'	177'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5
Mix e' (µl)	42	Mix f' (µl)	43	43
KIN R (µl)	1	KIN R (µl)	1	
KIN G (µl)	1	KIN G (µl)		1
Taq pol. (µl)	1	Taq pol. (µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

Concentration des amorces 20 pM.

	178'	Contrôles	179'	180'
ADNc (1ère PCR) (µl)	5	ADNc (1ère PCR) (µl)	5	5
Mix e' (µl)	42	Mix f' (µl)	43	43
KIN R (µl)	1	KIN R (µl)	1	
KIN G (µl)	1	KIN G (µl)		1
Taq pol. (µl)	1	Taq pol. (µl)	1	1
Total (µl)	50	Total (µl)	50	50

La figure 29 nous montre trois pistes intéressantes. Il s'agit des pistes 172', 175' et 178'. Toutes trois possèdent une bande à 350 bp. Les pistes 173' et 174' correspondent à de la RAPD. Les pistes x correspondent à des marqueurs de taille.

Tous les fragments amplifiés avec les amorces KIN R et KIN G, à des concentrations différentes, possèdent la même taille : 350 bp. En conséquence, tous les échantillons sont mis ensemble.

3.4. Clonage dans SK⁺

La totalité de l'échantillon est passé sur un gel d'agarose 1% n'ayant qu'un seul puits, en plus des 2 marqueurs de taille. Le fragment se situant à 350 bp est extrait du gel par la méthode NA45. Cette méthode consiste à faire migrer la bande désirée sur un morceau de papier de nitrocellulose (NA45) préalablement placé dans le gel. Cette méthode a pour avantage l'obtention d'une bande spécifique.

Des manipulations supplémentaires par rapport au précédent clonage sont nécessaires. Les amorces kinases ne doivent pas être restreintes car elles ne possèdent pas à leurs extrémités de site de restriction. Quant au vecteur, il est restreint avec SmaI. Pour l'amplification d'un brin d'ADN, nous utilisons la Taq polymérase (Taq pol.). Cette enzyme a tendance à rajouter des nucléotides (A) au produit d'amplification, ce qui empêche la ligation à bouts droits. D'où la nécessité d'enlever ces "A" (voir matériels et méthodes).

Une autre manipulation est nécessaire : la phosphorylation du fragment amplifié. En effet, les amorces ne sont pas phosphorylées, de même que que le plasmide restreint par SmaI pour l'empêcher de se refermer sur lui-même.

3.4.1. Mise au point du rapport Insert/SK⁺ pour la ligation.

De nombreux rapports ont été essayés : 1/1; 1/2.5; 1/5; 1/10; 1/20.

Nous avons utilisé le rapport 1/5, qui a produit le nombre le plus élevé de colonies transformantes.

3.4.2. Contrôles.

La ligation de SK⁺ avec les fragments PCR est réalisée dans un volume de 20 µl à 16°C pendant une nuit sous l'action de la ligase. Ces conditions expérimentales vont être respectées au cours des différentes ligations. Dès que le clone est obtenu, il va être introduit dans des cellules électrocompétentes par électroporation.

Les mêmes contrôles que pour le clonage précédent sont réalisés : la résistance des transformants à l'ampicilline et le test blanc-bleu. Si le clonage a bien eu lieu, les colonies seront blanches.

3.4.3. Sélection des clones intéressants.

Les colonies blanches sont sélectionnées et mises en culture. Les plasmides en sont extraits et contrôlés par une double restriction réalisée avec XbaI et HindIII. Ensuite, les échantillons sont mis sur gel d'agarose 1%.

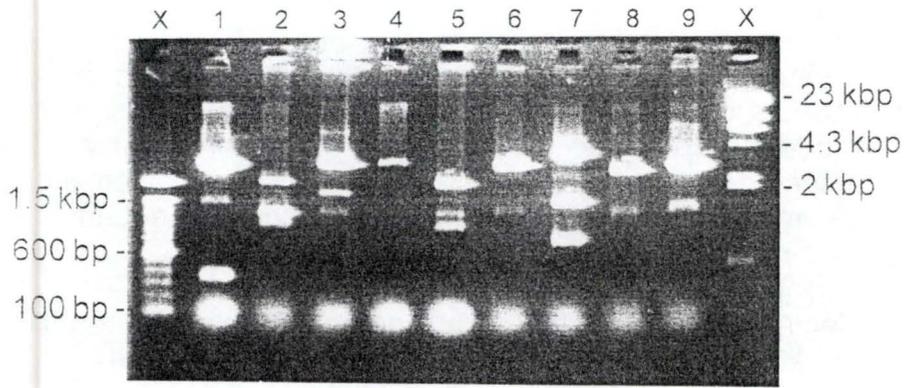


Fig. 30 : Restriction enzymatique avec les enzymes XbaI et SmaI. X : marqueurs de taille.

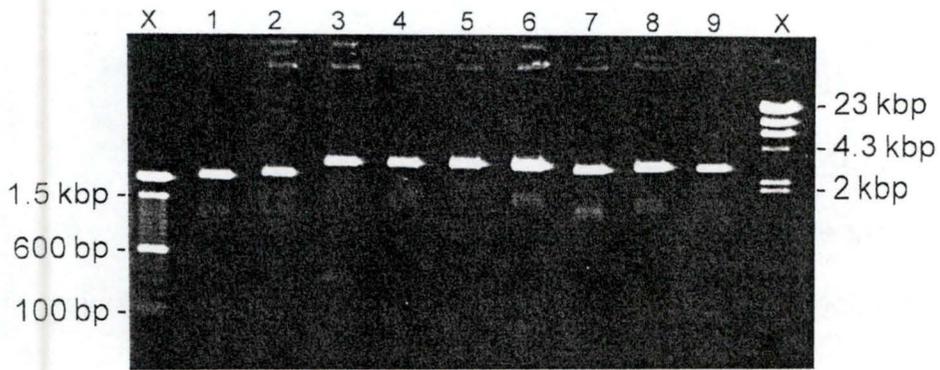


Fig. 31 : Restriction enzymatique avec les enzymes XbaI et SmaI. X : marqueurs de taille.

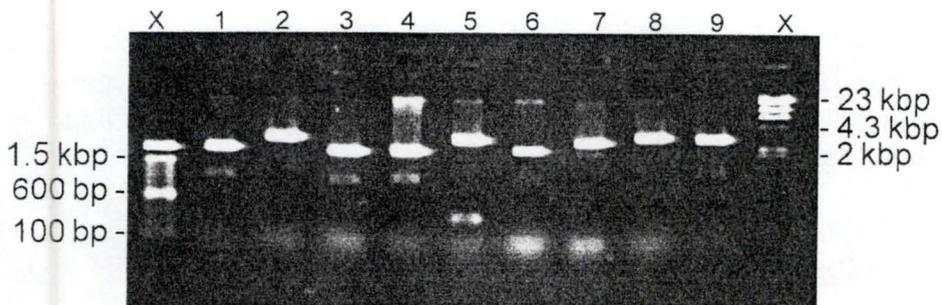


Fig. 32 : Restriction enzymatique avec les enzymes XbaI et SmaI. X : marqueurs de taille.

Résultats

Les figures 30, 31 et 32 montrent les restrictions effectuées sur les clones. Les pistes correspondent aux extractions des plasmides de différentes colonies blanches. Dans chaque piste, on retrouve 3 bandes. La première (23 kbp), représente de l'ADN génomique. Les 2 autres bandes représentent d'une part le plasmide restreint et d'autre part une forme surenroulée du plasmide que l'on ne peut restreindre (1300 bp). Dans la piste 1 pour la figure 30, dans la piste 3 pour la figure 31 et dans la piste 5 pour la figure 32, nous avons une bande à 350 bp. Cette bande correspond à l'insert.

Grâce à cette double restriction, trois échantillons sont sélectionnés et vont pouvoir être séquencés.

3.5. Séquençage : 2 séquences hypothétiques.

Sur les 3 clones, 2 ont pu être séquencés convenablement. Le troisième n'a pu être déterminé. Voici les séquences que nous avons obtenues après révélation du gel.

3.5.1. Clone 1.

```
1  cccttctggg gtaggtactc gtgtgttcca acaaatgaca ttgatcgtgc
51  ctcgattggc tcttgctacc atcctgaacc gccgtogaat cgttcttctt
101 cttctttgcc tgtgtttaga gtactaagca cgagacatgt ggcacgatac
151 aatttggcag aa
```

3.5.2. Clone 2.

```
1  gattttaagc cagagaacgt attggtccga gaagatggtc atatcatgct
51  tactgatttt gatctctcac tcagatgttc agttaatccg actcttctaa
101 aatcgncttc actcggggtg gaggctnccc gg
```

3.6. Analyse des banques de données.

3.6.1. Clone 1.

Liste des 40 meilleures séquences homologues trouvées au moyen de la fonction FASTA du programme GCG.

```
Gb_P1:Athatpk /rev D10910 Arabidopsis thaliana Atpk7 gen...
Em_P1:S50281 /rev S50281 Atpk7=protein kinase homolog [A...
Gb_P1:Athpk5 /rev D10909 A.thaliana gene for putative se...
Gb_P1:Phvpvpk /rev J04555 P.vulgaris PVPK-1 protein, com...
```

Résultats

Gb_In:Cezk1098 /rev Z22176 Caenorhabditis elegans cosmid...
 Gb_Pl:Atthatpk64 /rev D10937 A.thaliana mRNA for protein ...
 Gb_Est:T21504 /rev T21504 3512 Arabidopsis thaliana cDNA...
 Gb_In:Celc50c3 L14433 C. elegans cosmid C50C3. 10/93
 Gb_In:Celzk353 /rev L15313 C. elegans cosmid ZK353. 10/93
 Gb_In:Cet19c11 /rev Z37979 Caenorhabditis elegans cosmid...
 Gb_Pl:Mzesmdpk /rev M62985 Maize putative protein kinase...
 Gb_In:Droabdala /rev L31790 Drosophila melanogaster (clo...
 Gb_Vi:Dentlseq M87512 Dengue virus type 1 complete genom...
 Gb_In:Celb0303 M77697 C.elegans cosmid B0303. 10/93
 Gb_Vi:Rrvnbcg /rev M20162 Ross River virus (RRV) (strain...
 Gb_Ov:Ranbr2 D21071 Bullfrog mRNA for beta-ryanodine bi...
 Gb_Pl:Ricg11a /rev J04556 Rice (O.sativa) G11A protein, ...
 Gb_In:Cef59a2 Z34801 Caenorhabditis elegans cosmid F59A2...
 Gb_Pl:Ysccln2a /rev M33265 S.cerevisiae cyclin 2 (CLN2) ...
 Gb_In:Cezk512 /rev Z22177 Caenorhabditis elegans cosmid ...
 Gb_Pl:Sciil26o Z23261 S.cerevisiae DNA for open reading ...
 Gb_In:Ceb0393 /rev Z37983 Caenorhabditis elegans cosmid ...
 Gb_In:Cezc84 /rev Z19157 Caenorhabditis elegans cosmid Z...
 Gb_In:Celf42g9 /rev U00051 Caenorhabditis elegans cosmid...
 Gb_Ro:Rateif2b /rev L10652 Rattus rattus eukaryotic init...
 Gb_Pr:Humcfvii /rev J02933 Human blood coagulation facto...
 Gb_Pl:Peapspk4 /rev M69033 Pea putative protein serine/t...
 Gb_Ba:Ecouw76 /rev U00039 E. coli chromosomal region fro...
 Gb_In:Drogldgmc /rev M29298 D.melanogaster glucose dehyd...
 Gb_Pl:Pincptrpg /rev D17510 Complete sequence of black p...
 Gb_Pr:Humptprz M93426 Human protein tyrosine phosphatase...
 Gb_Vi:Hehcmvcg X17403 Human Cytomegalovirus Strain AD169...
 Gb_In:Dmacetrna /rev X17572 D.melanogaster RNA for acety...
 Gb_In:Dmache /rev X05893 Drosophila melanogaster mRNA fo...
 Gb_Vi:Pcgpe /rev M26927 Gibbon ape leukemia virus gag, ...
 Gb_Vi:Hh6immearh /rev L25528 Human herpesvirus 6 immedia...
 Gb_Ov:Xlpomcb /rev X59369 X.laervis POMC-B gene for proop...
 Gb_Pl:Peapspk1 /rev M69030 Pea putative protein serine/t...
 Gb_Ba:Arroldna /rev X64255 A.rhizogenes genes rolA, rolB...
 Gb_Vi:Hppccgpa D17763 Hepatitis C virus RNA for polyprote...

La séquence ayant la plus grande homologie avec la nôtre correspond au gène *Atpk7* codant pour une protéine kinase chez *Arabidopsis thaliana*.

Alignement de la séquence nucléotidique du clone 1 avec une protéine sérine/thréonine kinase d'*Arabidopsis thaliana*.

Une identité de 67.9% sur une région de 131 pb est observée

	149	139	129	119	109	99
Kin.	GTATCGTGCCACATGTCTCGTGCTTAGTACTCTAAACACAGGCA-AAGAAGAAGAAGAAC					
Athatp	CAGCCAGTGTGTTTCACTCCTCGGTTCTTGTCTAAAGGAAAGCACAGGAAGAAGTCGAAC					
	2660	2670	2680	2690	2700	2710
	89	79	69		59	49
Kin.	GATTCGA--CGGCGGTTTCAGGATGGT-----AGC-AAGAGC-CAATCGA----GGCACGA					
Athatp	GATATGAGCCGCAAATCAGACCGCTTCTGAGCTGATAGCTGAACCGACTAGCGCAAGG					

Résultats

La séquence ayant la plus grande homologie avec la nôtre correspondrait à un gène codant pour une sérine/thréonine kinase chez *Arabidopsis thaliana*.

Alignement de la séquence nucléotidique du clone 2 avec une sérine/thréonine protéine kinase d'*Arabidopsis thaliana*.

Une identité de 69,7 % sur une région de 132 pb est observée.

```

                                10      20      30
Kina.                          GATTTTAAAGCCAGAGAACGTATTGGTCCGA
                                ||| ||||| || ||||| | || |||
Athpk5 TACCTGCACATGCTTGGGATTGTGTATCGAGATCTTAAGCCTGAAAACGTTCTAGTTCGA
        3110      3120      3130      3140      3150      3160

                                40      50      60      70      80      90
Kina.  GAAGATGGTCATATCATGCTTACTGATTTTGATCTCTCACTCAGATGTTTCAGTTAATCCG
        ||||| || ||||| ||||| ||||| || || ||| ||||| || | |||
Athpk5 GAAGACGGACATATAATGCTCTCTGATTTTGACCTTTCTCTCCGATGTCTTGTTCAGCCCG
        3170      3180      3190      3200      3210      3220

                                100     110     120     130
Kina.  ACTCTTCTAAAATCGNCTTCACTCGGGGTGGAGGCTNCCC GG
        ||||| | ||||| :| | ||| | || ||: |||
Athpk5 ACTCTAGTGAAATCTGCCGCCATCGAGTCAGATCCTTTACGGAAAAACGTTTACTGTGTG
        3230      3240      3250      3260      3270      3280

```

3.6.3. Alignement des séquences en acides aminés avec des kinases végétales connues.

Les séquences des clones 1 et 2 sont traduites en acides aminés. Ces séquences sont comparées avec celles de kinases végétales connues.

Sérine/thréonine protéine kinase de *Pisum sativum*
 Protéine kinase G11A d'*Oryza sativa*
 Protéine kinase dépendante de second messenger de *Zea mays*
 Protéine kinase d'*Arabidopsis thaliana*
 Protéine kinase PVPK-1 de *Phaseolus vulgaris*
 Sérine/thréonine protéine kinase d'*Arabidopsis thaliana*
 Sérine/thréonine protéine kinase Atpk7 d'*Arabidopsis thaliana*
 Protéine kinase de *Mesembryanthemum cristallinum*

```

                                1                                50
joseq.msf{Seq3} .....
joseq.msf{Seq6} .....mas
joseq.msf{Seq2} .....
joseq.msf{clone1} .....
joseq.msf{Seq4} .....
joseq.msf{Seq5} messvngvds lsevqnsvsq vhhhdplpsg tpqpsrpplr asrnydgghq
joseq.msf{Seq9} .....
joseq.msf{Seq8} .....

```

Résultats

joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}
	51								100
joseq.msf{Seq3}
joseq.msf{Seq6}	TrkpsgHgae	VeaQKrSssn	SSTKSakaet	fepmqlQrsv	tnpRavgIpe				
joseq.msf{Seq2}	EVVq
joseq.msf{clone1}
joseq.msf{Seq4}
joseq.msf{Seq5}	TkaihhHnsh	VinQKhShqe	gkTlkqeglp	tklsSkQppl	dDSkGcEpng				
joseq.msf{Seq9}
joseq.msf{Seq8}m	dssssvvyvg	SSsKSrnfqs	kskgSitsfs	iDSRGtkksm				
joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}
	101								150
joseq.msf{Seq3}
joseq.msf{Seq6}	skrLpesfrk	rSsDpavckP	DfsSlstvle	hvdSLTIDEk	ktSgFGSvkt				
joseq.msf{Seq2}	Keqkstqhqn	ESiDltgSnd	pAevkAegnl	VpkrLadEEK	gvvedGiang				
joseq.msf{clone1}
joseq.msf{Seq4}	mmaSkTpEgs	lTnSsqSmsI				
joseq.msf{Seq5}	vlesekkrvv	DnhgknySqP	DAtfcASpqn	sfySaTVyse	akeSFtnteV				
joseq.msf{Seq9}
joseq.msf{Seq8}	KtlLipepep	tSpEvieSsv	ssvSaeSetp	Isiirkkkqs	eprfYsSptn				
joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}
	151								200
joseq.msf{Seq3}
joseq.msf{Seq6}	SsasaklSdg	tSslgktSgS	AkLsGRlDfm	Esg.KSSICR	gSTSSDVSD				
joseq.msf{Seq2}	SLksssalgk	ehgIASaSgS	ArLVGRsEtg	ErgfsSSrCR	pSTSSDVSD				
joseq.msf{clone1}
joseq.msf{Seq4}	ntladvSSS	lSfadpSSdg	ktgnskineq	gEsgKSSrCR	pSTSSDISDE				
joseq.msf{Seq5}	SeCasvdkSc	eSeVANSSd.f	nEsrKtSICR	aSTgSDaSDE				
joseq.msf{Seq9}
joseq.msf{Seq8}	tFYteakqSf	tntefSecaS	istIGiggid	lEkngvmIYR	gSigSDVSD				
joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}
	201								250
joseq.msf{Seq3}KPHKs.NDs	kWEAIQvVRT	KEG.svGLgH	FRLlKrLGCG				
joseq.msf{Seq6}	SSCSSFSStV	nKPHKA.NDl	RWEAIQAVRv	RDG.lLGLSH	FRLlKrLGCG				
joseq.msf{Seq2}	SaCSSiSS.V	tKPHKA.NDs	RWEAIQmIRT	RDG.iLGLSH	FkLLKkLGCG				
joseq.msf{clone1}
joseq.msf{Seq4}	StCSSFSSsI	nKPHKA.NDv	RWEAIQAVRT	khG.gLGLnH	FRLlKrLGCG				
joseq.msf{Seq5}	SStSSLSSvl	yKPHKA.NDi	RWEAIQAVRT	RDG.mLeMrH	FRLlKkLGCG				
joseq.msf{Seq9}
joseq.msf{Seq8}	SSsSgLSnaa	yKPHrdnNDk	RWvAIQeVRS	RvGssLeakd	FkLiKkLGgG				
joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}

Résultats

	251		300
joseq.msf{Seq3}	DIGSVYLS EL	SGT k CYFAMK	IMDKaSLASR KKL L RAQTER EILQ CL DHPF
joseq.msf{Seq6}	DIGSVYLS EL	SGT k CYFAMK	VMDK t SLASR KKL L RAQTER EILQ SL DHPF
joseq.msf{Seq2}	DIGSVYLS EL	SGT e sYFAMK	VMDK a SLASR KKL L RAQTE k EILQ CL DHPF
joseq.msf{clone1}
joseq.msf{Seq4}	DIG t VhLaEL	nGT r CYFAMK	VMDK t aL a SR KKL L RAQTER EILQ CL DHPF
joseq.msf{Seq5}	DIGSVYLaEL	SGTr t sFAMK	VMnK t eL a nR KKL L RAQTER EILQ SL DHPF
joseq.msf{Seq9}efL a rR KK i sRAQTE t qIL r mLDHPF
joseq.msf{Seq8}	DIG n VYLaEL	iGT g vsF a vK	VMEK a aiA a r KKL v RAQTE k EILQ SL DHPF
joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}
	301		350
joseq.msf{Seq3}	LPTLYTHFET	DKFSCLVMEF	CPGGDLHTLR QkQPGKYFPE QAAKFYVAEV
joseq.msf{Seq6}	LPTLYTHFET	EKF S CLVMEF	CPGGDLHTLR QRQPGK h F s E QAvKFYIAES
joseq.msf{Seq2}	LPTLYTHFET	DKFSCLVMEF	CPGGDLHTLR QRQ r GKYFPE QAvKFYVAEI
joseq.msf{clone1}
joseq.msf{Seq4}	LPTLYsHFET	EKF S CLVMEF	CPGGDLHTLR QRQPGK r F t E QAAKFYVAEV
joseq.msf{Seq5}	LPTLYTHFET	Ei F SCLVMEF	CPGGDLHaLR QRQPGKYF s E hAvrFYVAEV
joseq.msf{Seq9}	LPTLYc q F t s	DnL S CLVMEY	CPGGDLH v LR QRQPG r C F tE QAArFYlAEV
joseq.msf{Seq8}	LPTLYsHFET	EmnSCLVMEF	CPGGDLH s LR QkQ r GKYFPE QAArFYVAEV
joseq.msf{Seq1}
joseq.msf{clone2}
	351		400
joseq.msf{Seq3}	LLALEYLHML	GIIYRDLKPE	NVLVREDGHI MLSDFDLSLR CAVSPTLlRS
joseq.msf{Seq6}	LLALEYLHML	GIVYRDLKPE	NVLVREDGHI MLSDFDLSLR ClVSP T Lvks
joseq.msf{Seq2}	LLAMEYLHML	GIIYRDLKPE	NVLVREDGHI MLSDFDLSLR CAVSPTLIRS
joseq.msf{clone1}DfKPE	NVLVREDGHI MLtDFDLSLR CsVnPTLlks
joseq.msf{Seq4}	LLAMEYLHML	GIIYRDLKPE	NVLVRDDrHV MLSDFDLSLR CtVSl s iVRS
joseq.msf{Seq5}	LLsLEYLHML	GIIYRDLKPE	NVLVREDGHI MLSDFDLSLR CsVSP T Lvks
joseq.msf{Seq9}	LLALEYLHML	GVVYRDLKPE	NILVREDsHI MLSDFDLSLR CAVSPTLlvS
joseq.msf{Seq8}	LLAMEYLHML	GIIYRDLKPE	NVLVREDGHI MLSDFDLSLR CAVSPTLVrf
joseq.msf{Seq1}DLKPE	NVLiqsnGHV sL t DFDLS..
joseq.msf{clone2}
	401		450
joseq.msf{Seq3}	SNpsgDnqkg	.NPAY...CV	QPvCIEPaC. mQPSCvt t TT CFsPRFFSSK
joseq.msf{Seq6}	aaIesDpLRK	.N.vY...CV	QPACIEPSC. IQPSCtvPTT CFsPRLFSSK
joseq.msf{Seq2}	SNpdaEaLRK	nNqAY...CV	QPACVEPSCm IQPSCatPTT CFgPRFF...
joseq.msf{clone1}	xslgvEaxR.
joseq.msf{Seq4}	aNVgsEgLSk	nsvsC...sq	QPACIqqpsC I...smaPTs CFgPRFFSSK
joseq.msf{Seq5}	SN....nLqt	kssqY...CV	QPSCIEPtCv mQPdCikP.s CFTPRFLSgK
joseq.msf{Seq9}	Ssmsatskkm	sgPcvdsrCV	QPlCIqPSCq V.....T CFTPRLLaSS
joseq.msf{Seq8}	aaItlEskss	s.....yCI	QPtCVDqSsC Ivqpdciqpv CFTPRFLS..
joseq.msf{Seq1}clT sckPqLilpa
joseq.msf{clone2}lpn CivPhvsclly
	451		500
joseq.msf{Seq3}	SKEKKDkKaK	aDwaN.QVRP	LPELVAEPTD Ak.SMSFVGT HEYLAPEIIK
joseq.msf{Seq6}	S..KKDRKPK	NdtaN.QVRP	LPELVAEPTD AR.SMSFVGT HEYLAPEIIK

Résultats

```

joseq.msf{Seq2} SKsKKDRKPK pEvvN.QVsP wPELIAEPSD AR.SMSFVGT HEYLAPEIIK
joseq.msf{clone1} .....
joseq.msf{Seq4} S..KKDkKPK tEngNhQvTP LPELVAEPTg AR.SMSFVGT HEYLAPEIIK
joseq.msf{Seq5} SKkdKksKPK NdmhN.QvTP LPELIAEPTn AR.SMSFVGT HEYLAPEIIK
joseq.msf{Seq9} SKlrKmk... ..sdlemkP LlqLVAEhTD AmltnSFVGT HEYLAPEIyK
joseq.msf{Seq8} ...KgkhrkK sndmsrQIRP LPELIAEPTs AR.SMSFVGT HEYLAPEIIK
joseq.msf{Seq1} ieEKKkRkkK knkgqqknqq vPmFmAEPmr A..SnSFVGT HEYLAPE...
joseq.msf{clone2} SKhrqrRrrt .....IRr rfrMVAEPIe AR.SMSFVGT HEYLAPE...

501                                                                                               550
joseq.msf{Seq3} GEGHGSAVDW WTFGIFLYEL LFGKTPFKGS GNRATLFNVV GQPLRFPEsp
joseq.msf{Seq6} GEGHGSAVDW WTFGIFLYEL LFGGrTPFKGS GNRqTLFNVV GQPLRFPEtP
joseq.msf{Seq2} GEGHGSAVDW WTFGIFLYEL LFGKTPFKGS GNRATLFNVI GQPLRFPEyP
joseq.msf{clone1} .....
joseq.msf{Seq4} GEGHGSAVDW WTFGIFLYEL LFGKTPFKGS GNRATLFNVV GQPLRFPEsp
joseq.msf{Seq5} GEGHGSAVDW WTFGIFLYEL LFGGrTPFKGS aNRATLFNVI GQPLRFPEsp
joseq.msf{Seq9} GEGHGSAVDW WTFGIssTsF ymensPLKeg ndRt.....
joseq.msf{Seq8} GEGHGSAVDW WTFGIFLYEL LFGiTPFrGg dNRATLFNVV GQPLRFPEhP
joseq.msf{Seq1} .....
joseq.msf{clone2} .....

551                                                                                               600
joseq.msf{Seq3} VVSFAARDLI RGLLIKEPQH RLAYKRGATE IKQHPPFEGV NWALIRCAtP
joseq.msf{Seq6} VVSFAARDLI RGLLmKEPQq RLgFKRGATE VKQHPPFEGV NWALIRCAtP
joseq.msf{Seq2} VVSFsARDLI RGLLVKEPQq RLgCKRGATE IKQHPPFEGV NWALIRCAsP
joseq.msf{clone1} .....
joseq.msf{Seq4} VVSFAARDLI RsLLVKEPQH RLAYKRGATE IKQHPPFEGV NWALVRCAsP
joseq.msf{Seq5} tVSFAARDLI RGLLVKEPQH RLAYrRGATE IKQHPPFqnv NWALIRCAtP
joseq.msf{Seq9} .....
joseq.msf{Seq8} nVSFAARDLI RGLLVKEPQH RLAYrRGATE IKQHPPFqsV NWALIRCtsP
joseq.msf{Seq1} .....
joseq.msf{clone2} .....

601                                                                                               649
joseq.msf{Seq3} PDIPKPVEip Rsv.....As SsQKatsA.. .....AeKgS D.YLELEFF
joseq.msf{Seq6} PEIPKPVEIE kgAvSVaeAp SsQKtaAg.. .lvlnAqKgS DNYLEFDFF
joseq.msf{Seq2} PEVPrPVEiE Rpp...Kqpv StsepaAA.. .PSDaAqKsS DsYL.....
joseq.msf{clone1} .....
joseq.msf{Seq4} PEIPKPVil. ....Klln ptptvpAA.. .aSssvrsdq sNYLEFDFF
joseq.msf{Seq5} PEVPrqVi.. ..... nlpqt.. .ekDlqvKpS gNYLDiDFF
joseq.msf{Seq9} .....
joseq.msf{Seq8} PqIPqPVkpm dqAhSVrhgf Sqghghvgyd kPptvdvKpS gNYLEiDFF
joseq.msf{Seq1} .....
joseq.msf{clone2} .....

```

Les deux séquences obtenues correspondent donc bien à des kinases végétales.

CHAPITRE 4 : DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

1. Les Récepteurs couplés aux protéines G.

1.1 Rappels des résultats.

Le type de récepteur que nous avons cherché est caractérisé par sept régions transmembranaires. Ces sept régions sont conservées, ce qui permet de définir des amorces. Quatre des huit amorces que nous avons utilisées, nous ont été communiquées par le Docteur Parmentier du département de génétique moléculaire de l'Hôpital Erasme de l'ULB (Gprot 2,3,6 et 7b).

G prot 2 : 5'-TAG-ATC-TAG-ACY-TGK-CS5-KBG-CYG-AYM-T-3'

G prot 3 : 5'-TAG-ATC-TAG-ACA-T5R-S5S-YKG-ASM-GST-RC-3'

G prot 6 : 5'-ACT-TAA-GCT-TAG-GGC-AGC-CAG-CAG-AKS-BYR-AA-3'

G prot 7b : 5'-ACT-TAA-GCT-TGC-ART-ARM-HSA-5RG-GRT-T-3'

Les quatre autres amorces proviennent d'alignements de séquences entre les récepteurs acétylcholine (2) et les récepteurs adénosyls (2).

Adeno 3 : 5'-TAG-ATC-TAG-ATA-YAT-GGT-NTA-YTT-YAA-YTT-YTT-Y-3'

Adeno 7 : 5'-ACT-TAA-GCT-TRT-TCA-TNG-CNS-WRT-TNC-C-3'

Acetyl 3 : 5'-TAG-ATC-TAG-AAA-YGC-NWS-NGT-NAT-GAA-Y-3'

Acetyl 7 : 5'-ACT-TAA-GCT-TNA-CRT-ARC-ANA-RCC-ART-A-3'

Dans un premier temps, nous avons réalisé des PCR avec ces amorces. Celles-ci ont été utilisées à des diverses concentrations : 100 pM, 50 pM, 20pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM. La plupart des bandes observées sur gel avec les amorces Gprot, correspondent à de la RAPD (amplification à partir d'une seule amorce). Les autres bandes nous ont permis de sélectionner les échantillons intéressants. Ces bandes avaient une taille de 100 bp. En ce qui concerne les PCR avec les amorces adeno et acetyl nous n'avons rien amplifié.

Dans un deuxième temps, nous avons séquencé les fragments de 100 bp. Par comparaison avec une banque de données, nous avons obtenu des séquences qui présentaient divers degrés d'homologie avec notre fragment d'ADN. Celle avec la plus grande homologie correspond à une tyroglobuline.

1.2. Discussion.

1.2.1. Protéines G chez les cellules animales.

Le complexe récepteur-protéine G traduit l'information extracellulaire en signaux intracellulaires qui régulent les fonctions cellulaires. Il existe chez les cellules

animales des centaines de récepteurs de ce type qui transmettent l'information à un nombre relativement restreint de protéines G. Dans le passé, la plupart de ces voies de transduction des signaux étaient conceptualisées suivant un mode linéaire : une hormone interagit avec un récepteur. Ce dernier interagit dès lors avec une protéine G activant un messenger secondaire. Actuellement ce concept est revu pour trois raisons :

- Une hormone peut se lier à de nombreux récepteurs différents appartenant à une même catégorie.
- Il existe des centaines de récepteurs appartenant à une même catégorie, mais il y a un nombre limité de protéines G disponibles.
- Des récepteurs interagissant avec diverses hormones peuvent se coupler à un même groupe de protéine G.

Ceci a été montré par des études sur des récepteurs A_1 adénosines, β -adrénergiques et α_2 -adrénergiques. Ces études furent réalisées sur des vésicules phospholipidiques regroupant des récepteurs. Il fut montré notamment, qu'ils activaient à la fois la protéine G_s et la protéine G_i (Raymond, 1995).

1.2.2. Protéines G chez les cellules végétales.

Jusqu'à ces dernières années, il existait seulement des preuves indirectes de la présence de protéines G chez les plantes. De telles preuves furent fournies par trois types d'études :

- Premièrement, par l'utilisation d'un analogue du GTP : le $GTP\gamma S$ qui active les protéines G, et par un analogue du GDP : le $GDP\beta S$ qui empêche l'activation des protéines G.
- Un deuxième type d'étude consistait en l'utilisation des toxines du choléra et du pertussis.
- Le troisième type d'étude fut mené à bien grâce à des antisera dirigés contre les protéines G animales ou contre des peptides synthétiques correspondant aux domaines des protéines G.

En plus de cela, certaines molécules présentent chez les cellules végétales et ayant leurs contreparties chez les cellules animales, sont connues pour être régulées par les protéines G. Nous pouvons citer les canaux potassiques; la phospholipase A_2 ; la phospholipase C et la phospholipase D. Cela suggère que la transduction du signal chez les végétaux peut être analogue à ce qui existe chez les cellules animales. En effet, des études récentes ont établi qu'à la fois le $GTP\gamma S$ et le mas-7, lequel est un analogue du mastoparan, activent les protéines G. Cette activation est provoquée par sa structure qui est similaire à la troisième boucle intracellulaire des récepteurs à sept domaines transmembranaires et qui sont couplés aux protéines G. Celles-ci inhibent l'entrée des ions potassiques à travers les canaux membranaires chez les cellules de garde chez *Vicia Faba*. De plus, le $GTP\gamma S$ augmente le turnover des phosphatidyl inositols chez *Acer pseudoplatanus* et stimule l'activité de la phospholipase C chez les plantes (Armstrong et Blatt, 1995; Causier et Millner, 1996).

1.2.3. Récepteurs couplés aux protéines G.

Ces observations nous ont amené à penser que les récepteurs couplés aux protéines G seraient conservés du moins dans les régions transmembranaires. De plus, certains articles parus dans la littérature suggéraient la présence de tels récepteurs chez les cellules végétales.

Bennet et *al.* (1994), ont obtenu un mutant dont la sensibilité à l'éthylène et à l'auxine était réduite. Ce mutant a été obtenu par la méthode dénommée *T-DNA tagging*. Pour cela, ils ont utilisé l'ADN-T d'*Agrobacterium*. *Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie qui provoque une modification du génome chez ses hôtes cellulaires eukaryotiques. Cela a pour conséquence que les cellules se développent comme une tumeur. L'élément génétique induisant une tumeur réside dans le plasmide Ti. Ce plasmide est perpétué dans la bactérie comme un réplicon indépendant. La bactérie ne rentre pas dans la cellule, mais transfère une partie du plasmide Ti dans le génome de la plante. La partie transférée s'appelle l'ADN-T. Cet ADN-T va être modifié au niveau de sa séquence pour servir de vecteur afin d'introduire les éléments qui vont provoquer des mutations dans le génome de la plante. Bennet et *al.* (1994) ont obtenu la séquence où l'ADN-T s'était inséré. Cette séquence fut utilisée pour cibler une librairie d'ADN génomique et d'ADN complémentaire d'*Arabidopsis*. Il identifia la séquence comme étant un gène codant pour un récepteur couplé aux protéines G en se référant aux séquences des récepteurs couplés aux protéines G chez les cellules animales.

Armstrong et Blatt, en étudiant les flux de potassium ont utilisé le mas-7 qui est un analogue du mastoparan imitant la troisième boucle intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G.

Avec tout ceci à l'esprit, nous avons décidé de relever le défi : mettre en évidence un récepteur à sept domaines transmembranaires chez les cellules végétales. Pour cela, il nous fallait une technique qui permette de mener à bien cette recherche. Mollereau et *al.* (1994); Libert et *al.* (1989); Parmentier et *al.* (1989), ont utilisé avec succès la PCR (*polymerase chain reaction*) chez les cellules animales. Les amorces ont été définies par un alignement de séquences avec les séquences connues pour coder des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Cette technique a permis de découvrir de nombreuses séquences codant pour des nouveaux récepteurs à sept domaines transmembranaires.

Au vu de ces résultats, nous avons procédé de la même manière pour notre recherche chez *Nicotiana tabacum*. Très vite, nous nous sommes heurtés à quelques problèmes. L'extraction d'ARN messager fut laborieuse. En effet, les concentrations en polysaccharides de nos échantillons étaient très élevées. Cela provoqua quelques difficultés pour séparer l'ARN messager de l'ARN total. Les fragments obtenus après amplification ont été insérés dans des plasmides. Ceux-ci ont été introduits dans des cellules électrocompétentes par électroporation. De nombreux problèmes sont apparus lors de la réalisation de ces deux étapes. Par le test blanc-bleu nous pouvons détecter les colonies transformantes sur boîte de Pétri. Ces colonies étaient blanches pour celles qui contenaient l'insert. Après vérification par restriction enzymatique du plasmide, certaines de ces colonies

blanches ne possédaient pas l'insert. Nous avons donc du procéder à une mise au point des conditions de ligation entre le plasmide et l'insert. Malgré cela, le rendement des transformations et des ligations fut très faible.

Une partie importante de ce mémoire a donc consisté à rechercher des fragments amplifiés par PCR et par l'adaptation des techniques de PCR, de transformation et de ligation pour notre recherche. Cette démarche se justifiait par la présence de récepteurs couplés aux protéines G chez les cellules végétales. L'utilisation de la PCR utilisée avec succès par le Docteur Parmentier ne nous a pas permis de mettre en évidence l'existence de récepteurs à sept domaines transmembranaires chez *Nicotiana tabacum*. Rappelons que nous avons dû utiliser des amorces qui étaient fortement dégénérées, ce qui pourrait expliquer les nombreux cas de RAPD que nous avons eus.

1.3. Conclusions.

Plusieurs types de récepteurs peuvent interagir avec des protéines G chez les cellules animales : il y a un grand nombre de récepteurs pour un nombre limité de protéines G. De plus Ren et *al.* (1994) ont montré qu'un épissage alternatif de l'ARN messager dérivé de cinq exons de la région 5' non traduite du gène codant pour le récepteur A₁ adénosine contrôle les niveaux d'expression de ce récepteur. D'autres études ont montré que certains récepteurs peuvent être fonctionnellement exprimés à partir d'un simple gène par le épissage alternatif de l'ARN. Le gène produit au moins quatre récepteurs distincts par épissage alternatif différant de la séquence carboxy-terminale (Ren et *al.*, 1994). Mais chez les plantes, il n'y a pas d'organes sensitifs organisés comme chez les animaux. Les récepteurs seraient largement distribués chez les cellules végétales, mais en faible quantité. Cela expliquerait la difficulté rencontrée lorsque nous recherchions un fragment amplifié par la PCR. L'ARN messager serait en très faible quantité.

Nous pourrions également envisager que les protéines G chez les cellules végétales soient associées à un autre type de récepteur. En effet, la littérature fait mention de récepteurs kinases couplés aux protéines G. Cette famille possède la caractéristique unique de phosphoryler les récepteurs couplés aux protéines G quand ils sont dans leurs formes actives. Deux membres de cette famille ont été particulièrement étudiés : il s'agit de la β ARK1 (β -adrenergic receptor kinase 1) et de la rhodopsin kinase. La présence de récepteurs homologues fut mise en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*, suggérant une longue évolution qui pourrait être parallèle à celle des récepteurs couplés aux protéines G (Lefkowitz, 1993; Pitcher et *al.*, 1995).

1.4. Perspectives.

Bennet et *al.* (1994) possédaient un mutant dont la sensibilité à l'auxine et à l'éthylène est réduite. Ils possèdent également la séquence du gène muté. A partir de cette séquence, il pourrait exprimer la protéine, et déterminer des amorces afin de réaliser des PCR pour détecter d'autres récepteurs de ce type. Apparemment, depuis la publication de cet abstract, plus rien n'est paru dans la littérature.

Une autre méthode consisterait à précipiter le complexe récepteur-ligand par différents détergents. Dans le cadre de recherche de notre laboratoire, le ligand serait un fragment pectique dont le degré de polymérisation serait supérieur ou égal à neuf. Le récepteur serait quant à lui, le récepteur recherché dont les protéines G éventuellement associées ont été mises en évidence. Cette méthode est séduisante, mais chez les plantes, il n'y a pas d'organe sensitif organisé comme chez les animaux ce qui pourrait rendre difficile la précipitation des complexes récepteurs-ligands. D'autre part, l'affinité entre les fragments pectiques et les récepteurs est très faible. Les complexes que nous pourrions obtenir seraient en si faible quantité qu'ils seraient difficilement détectables.

D'autres méthodes pourraient être envisagées :

Nous pourrions marquer les fragments pectiques pour qu'ils soient détectables. Pour cela, il faudrait un marqueur dont l'activité serait assez élevée pour en détecter de faibles quantités, par exemple, le carbone 14 et l'iode radioactif. Malheureusement, l'utilisation du carbone 14 nécessiterait une logistique assez lourde que nous ne possédons pas. D'autre part, rappelons la faible affinité des fragments pectiques pour les récepteurs. Quant à l'iode radioactif, le marquage ne peut se faire facilement qu'à une des deux extrémités de ces fragments pectiques, or, ce sont justement ces extrémités qui interagissent avec le récepteur.

Enfin, nous avons la technique de l'*expression cloning*. Cette technique utilise des oeufs de Xénopes. Dans ces oeufs, nous introduirions de l'ARN messager. Cet ARN messager serait traduit en protéines. En supposant que la séquence que nous recherchons soit traduite, nous aurions notre récepteur en surface de l'oeuf. En ajoutant des fragments pectiques dont le degré de polymérisation est supérieur ou égal à neuf, nous devrions observer une mobilisation du calcium à l'intérieur de l'oeuf. En répartissant notre ARN messager dans différents oeufs, nous pourrions "repérer" le brin d'ARN messager contenant la séquence recherchée.

2. Les kinases.

2.1. Rappel des résultats.

Dans le cadre de la transduction du signal, les kinases constituent des cascades d'amplification à l'intérieur de la cellule. En utilisant la méthode de PCR, nous avons tenté de mettre en évidence des kinases.

Nous avons défini des amorces PCR à partir d'un alignement de séquences. Parmi celles-ci, nous avons des séquences de protéines kinases provenant d'*Arabidopsis thaliana* et de *Saccharomyces cerevisiae*. Deux amorces ont été ainsi définies :

Kin R : 5'-YTC-NGG-NGC-NAR-STA-YTC-TRG-NGT-NCC-3'

Kin G : 5'-GAY-YTN-AAR-CCN-GAR-AAY-GT-3'

Les conditions expérimentales définies pour la recherche des récepteurs couplés aux protéines G ont été appliquées dans le cadre de la recherche des kinases. Rappelons les différentes concentrations des amorces : 100 pM; 50 pM; 20 pM; 5 pM; 1 pM. A partir de l'ADN complémentaire et de l'ADN génomique de tabac, nous avons amplifié un fragment de 350 bp. Cette bande s'observe sur gel, avec différentes concentrations d'amorces.

Dans un premier temps, nous avons extrait cette bande en la faisant migrer sur un morceau de papier de nitrocellulose (NA45).

Dans un deuxième temps, nous avons cloné ce fragment avec SK⁺. Cette construction fut dès lors introduite dans des cellules électrocompétentes. Après une sélection par le test blanc-bleu, nous avons extrait le plasmide et nous l'avons restreint afin de savoir s'il contenait notre insert. Après ce contrôle, nous avons séquencé cet insert et nous l'avons comparé aux banques de données.

2.2. Discussion.

Les protéines kinases ont été subdivisées en celles qui phosphorylent la sérine et la thréonine et celles qui phosphorylent la tyrosine. Le domaine catalytique des protéines kinases eukaryotiques a une longueur variant de 250 à 300 acides aminés avec des régions plus ou moins conservées. Il y a 12 régions conservées au sein de ce domaine catalytique. Ces kinases ont été classées en cinq groupes principaux suivant leurs homologies de séquences :

- le groupe "AGC" : il consiste en une famille dépendante de nucléotides cycliques : il regroupe la PKA et la PKG. Il comprend également la famille des protéines kinases C et la kinase ribosomiale S6.

- Le groupe "CaMK" : il consiste en des kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline et des protéines kinases SNF1 activées par l'AMPC.

- le groupe "CMGC" : il contient les CDK (Kinases dépendantes de la cycline); les MAPK (*mitogen activated protein kinase*); la GSK-3 (*glycogen synthase kinase*); CKII (*casein kinase II*).

- le groupe "PTK" : il contient les protéines kinases phosphorylant la tyrosine.

-le cinquième groupe comprend les autres kinases non-citées.

Récemment, dans la littérature, des nouvelles kinases végétales ont été mises en évidence. Sur la base de la classification vue ci-dessus, voici ce qu'il en est chez les kinases végétales.

- le groupe "AGC" : le thème commun de ce groupe est la régulation par des messagers secondaires tel que l'AMPC, le diacylglycérol, le calcium et le cGMP. Actuellement, ce groupe comprend les CDPK (protéines kinases dépendantes du calcium) (Breviario et al., 1995; Lindzen et al., 1995) et les DGK (protéines kinases dépendantes du diacylglycérol). Cette dernière kinase fut récemment mise en évidence et séquencée par Katagiri et al., 1996. Elle synthétise de l'acide phosphatidique à partir du diacylglycérol (qui est un activateur des PKC) afin de

Discussions, conclusions et perspectives

resynthétiser les phosphatidylinositols. La structure de cette kinase n'a pas encore été caractérisée. Katagin et *al.* rapportent que cette kinase fut clonée et nommée cATDGK1. Elle fut mise en évidence chez *Arabidopsis Thaliana*. La séquence montre une similarité significative avec les DGK provenant du rat, du porc et de la drosophile. L'existence de cette DGK ainsi que de la phospholipase C permet de suggérer l'existence de PKC.

Rappelons que des PKC-like ont été mises en évidence chez les feuilles de riz par Masuda et *al.* (1994) et chez le soja par Honda et *al.* (1994).

Lindzen et Choi (1995) ont récemment mis en évidence et séquencé une isoforme des protéines kinases dépendantes du calcium. Elle est désignée CRK pour la *CDPK-related kinase*. A la différence des CDK, elle présente une faible homologie à la calmoduline.

- le groupe "CaMK" : ce groupe comprend les kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline et les kinases SNF1 activées par l'AMPc.

- le groupe "CMGC" : ce groupe comprend les CDK. Des homologues de la cycline sont présents chez végétaux (Stone et Walker, 1995). Il comprend aussi les MAPK. On en retrouve également chez les végétaux (Hultly et Phillips, 1995; Stone et Walker, 1995). Enfin, des homologues à la GSK-3 et à la CKII ont été mis en évidence (Stone et Walker, 1995).

-le groupe "PTK" : aucune protéine kinases de ce groupe n'a été identifiée.

- Le groupe "RLK" : ce groupe comprend les *receptors-like kinases* et les CTR1. Celle-ci est une protéine kinase appartenant à la famille des Raf kinases. Elle fut identifiée comme un gène dans lequel une mutation provoque une activation constitutive de la voie de transduction induite par l'éthylène (Stone et Walker, 1995).

D'autres kinases sont régulièrement mises en évidence. En effet, les mécanismes de transduction de signaux chez les végétaux sont beaucoup moins connus que chez les cellules animales.

Les deux séquences obtenues suite aux PCR effectuées avec les amorces KIN, furent analysées et comparées sur des banques de données. La première séquence correspond à un gène codant pour une sérine/thréonine kinase chez *Arabidopsis thaliana* nommée Atpk7. La seconde séquence correspond à un gène codant également pour une kinase chez *Arabidopsis thaliana* nommée Atpk5. Rappelons que le matériel utilisé provient de culture de cellules de tabac en milieu liquide. Dans les listes des séquences homologues, nous n'avons pas de kinase provenant du tabac. Cette kinase dont nous avons une séquence de 350 bp n'est donc pas encore caractérisée. Afin d'obtenir plus d'information sur cette kinase, des études supplémentaires doivent être réalisées. Au stade actuel de notre recherche, nous n'avons aucune information pouvant nous aider à déterminer à quel type de voie de transduction cette kinase appartient.

2.3. Perspectives.

Le premier objectif à atteindre serait l'obtention de la séquence complète de cette enzyme. Pour cela, nous pourrions réaliser des 3'-race et des 5'-race, c'est-à-dire que nous amplifierions l'ARN se situant de part et d'autre de notre insert. Cela nous permettrait d'avoir la séquence complète de cette kinase, depuis le site +1 jusqu'au codon de terminaison. La séquence qui serait ainsi obtenue serait vérifiée à nouveau par un alignement de séquences. Cela nous permettrait de décider si nous poursuivons les recherches. Il serait alors indispensable de connaître les types de tissus dans lesquels cette kinase est transcrite, traduite et accumulée. Une approche immunologique s'imposerait alors. Afin d'obtenir des anticorps, nous devrions exprimer cette protéine en grande quantité afin de l'inoculer dans le lapin. Pour exprimer cette protéine nous utiliserions le kit de *Stratagene : Affinity™ Protein Expression and Purification System*.

Avec ce kit, nous clonerions cette séquence dans le vecteur d'expression nommé pCaln. Après, nous introduirions cette construction dans les cellules permettant son expression : *Epicurian Coli* BL21. Nous induirions l'expression de la protéine en ajoutant de l'IPTG. La protéine serait exprimée avec une partie additionnelle nommée CBP : Calmodulin Binding Peptide.

La protéine ainsi obtenue serait purifiée en utilisant une colonne contenant une *calmodulin affinity resin*. En présence de calcium, les protéines se lient à la calmoduline par leurs extrémités (CBP). Quand nous ajoutons de l'EDTA à la colonne, il interagit avec le calcium et les protéines sont ainsi libérées et peuvent être éluées. Il suffirait dès lors d'introduire cette protéine chez le lapin pour obtenir des anticorps.

Afin de connaître le substrat de cette enzyme, nous incuberions notre protéine en présence des trois substrats des kinases : la sérine, la thréonine et la tyrosine. En essayant de respecter les conditions de phosphorylation *in vitro* et en ajoutant de l'ATP radioactif, nous serions capables de déterminer le substrat de la kinase par autoradiographie sur un chromatogramme.

Afin de caractériser cette kinase, nous étudierions également ses caractéristiques physico-chimiques. Nous déterminerions son poids moléculaire sur un gel SDS-polyacrylamide. Nous pourrions également déterminer les conditions de phosphorylation optimales. Pour cela, il faudrait étudier l'influence du pH, de certains ions et d'autres substances chimiques (AMPc, EDTA, TPA) sur cette kinase.

CHAPITRE 5 : MATERIEL ET METHODES.

1. Techniques relatives aux cultures cellulaires.

1.1. Culture de *Nicotiana tabacum*.

Milieu de culture :

- 4.49 g/l de MS (Murashige et Skoog) sans vitamines.
- 0.2 g/l de KH_2PO_4 .
- 30 g/l de sucrose.
- 0.2 mg/l de 2.4-D (pH5.4).
- 100 mg/l d'inositol.
- 0.1 mg/l de thiamine.

Maintenir les suspensions cellulaires de tabac en milieu de culture à 25°C sur un agitateur orbital VKS 75 Edmund Bühler dans des erlenmeyers de 250 ml. Renouveler le milieu de culture tous les 7 jours (dilution 1:26).

1.2. Culture d'*Escherichia coli*.

Milieu de culture :

- 20 g de LB/l.
- 2 ml de tétracycline (5 mg/ml).

Maintenir la culture 1 nuit sous agitation à 37°C dans un bain chauffant. Souche d'*E. Coli* : XL-1 Blue.

1.3. Culture de cellules électrotransformées.

Milieu de culture :

- 0.2 g de LB/10 ml.
- 20 µl de tétracycline (5 mg/ml).
- 20 µl d'ampicilline/10 ml (10 mg/ml).

Maintenir la culture 1 nuit sous agitation à 37°C dans un bain chauffant.

2. Techniques relatives aux acides nucleiques.

2.1. Extraction d'ARN total à partir de cellules en suspension.

- Filtrer un volume de 50 ml de cellules en suspension âgées d'une semaine sur buchner.
- Broyer l'amas de cellules dans un mortier contenant de l'azote liquide.

Matériels et méthodes

- Peser la poudre ainsi obtenue.
- Ajouter le plus rapidement possible à 15 g de poudre de cellules 25ml de trizol (tripure™ isolation reagent, boehringer manheim).
- Homogénéiser l'échantillon à l'ultra turax (*mèche RNAase free* : 6 heures dans un four à 150°C) jusqu'à l'obtention d'une solution dépourvue d'amas cellulaire.
- Laisser reposer l'échantillon dans la glace pendant 5 minutes.
- Ajouter 5 ml de chloroforme et agiter vigoureusement pendant 15 secondes. Laisser reposer à 4°C pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 30 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Récupérer la phase aqueuse (ne pas prélever au niveau de l'interface).
- Ajouter 15 ml d'isopropanol et placer à 4°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 30 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 10 ml d'éthanol 75%. Mélanger et agiter légèrement.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Resuspendre le culot dans 9 ml d'eau (*RNAase free*).
- Ajouter 3 ml de LiCl 8M et placer l'échantillon à 4°C pendant une nuit.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 30 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Laver le culot avec 5 ml de LiCl 2 M.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Laver le culot avec 5 ml d'éthanol 80%.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Resuspendre le culot dans un volume minimal d'eau (*RNAase free*).

2.2. Obtention d'ARN messager à partir d'ARNtotal.

(*Oligo(dT) cellulose columns*, GibcoBRL).

Utilisation d'une colonne de cellulose Oligo(dT).

Solutions :

Binding buffer (pH 7.5) : tris, 10 mM; EDTA, 1 mM; NaCl, 0.3 M; SDS, 0.1% (w/v).

Elution buffer (pH 7.5) : tris, 10 mM; EDTA, 1 mM; SDS, 0.1% (w/v).

- Préparation de la colonne :

Charger 1 ml de NaOH 0.1 M.

Equilibrer la colonne avec 4 ml de *binding buffer* (4x1ml).

Charger la colonne avec 1 ml de *binding buffer*, laisser en couler la moitié.

- Diluer l'ARN total dans 3 ml de *binding buffer*.

- Echantillon : le chauffer à 70°C pendant 5 minutes, ensuite le placer 5 minutes dans la glace.

- Charger cet échantillon sur la colonne (3x1 ml).

- Laver avec 4ml de *binding buffer* (4x1 ml).

Matériels et méthodes

- Eluer l'ARN messager avec 1.5 ml de *elution buffer* et le récupérer dans un tube stérile.
- Rééquilibrer la colonne avec 4 ml de *binding buffer*.
- Chauffer l'échantillon à 70°C pendant 5 minutes.
- Placer cet échantillon dans la glace pendant 5 minutes, ensuite 20 minutes à température ambiante.
- Ajouter 90 µl de NaCl 5 M. Passer immédiatement l'échantillon sur la colonne.
- Laver la colonne avec 4 ml de *binding buffer*.
- Eluer l'ARN messager avec 1.5 ml de *elution buffer*.
- Placer une cuvette en quartz dans une solution de NaOH 1M (minimum 1 heure).

- Doser cet ARN : utilisation du spectrophotomètre :
 - Placer 1 ml du volume élué dans la cuvette servant au spectrophotomètre.
 - Lire l'absorbance à 260nm.
 - Calculer la quantité d'ARN sachant qu'une DO de 1 équivaut 40 µg/ml.
- Ajouter 90 µl de NaCl 5M et 3 ml d'éthanol à l'éluat. Placer l'échantillon à -20°C pendant 1 nuit.
- Laver la colonne avec 1 ml de NaOH 0.1 M.
- Laver la colonne avec de l'eau (*RNAase free*) afin d'obtenir un pH neutre à sa sortie.
- Rééquilibrer la colonne avec 4 ml de *binding buffer*.
- Stocker la colonne à 4°C.

A l'échantillon :

- Mélanger le tube.
- Répartir dans le volume dans des eppendorfs.
- Centrifuger à 7000 rpm, à 4°C pendant 20 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Enlever le surnageant, ajouter au culot 1 ml d'éthanol.
- Centrifuger à 7000 rpm, à 4°C pendant 2 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Enlever le surnageant au $\frac{2}{3}$.
- Sècher l'eppendorf dans un bain à 50°C.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau (*RNAase free*).
- Stocker l'échantillon à -20°C

2.3. Synthèse du premier brin d'ADNc.

(*cDNA synthesis module*, amersham life science).

- Mettre le bain chauffant à 42°C, enlever les composants non-enzymatiques du kit et les dégeler.
- Dégeler l'ARN messager.
- Placer l'ARN messager et les composants non-enzymatiques du kit dans la glace.
- Dans l'ordre, ajouter dans un eppendorf :
 - first strand synthesis reaction buffer* : 4 µl.
 - sodium pyrophosphate solution* : 1 µl.
 - HPRI* : 1 µl.
 - dNTPmix* : 2 µl.

Matériels et méthodes

anchored dT₂₅ primer : 1 μ l.

ARN messenger : 1 μ g.

eau (*RNAase free*) : x μ l (volume total devant être de 19 μ l).

- Mélanger prudemment et centrifuger à 12000 rpm pendant quelques secondes (Centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Ajouter 1 μ l de *reverse transcriptase*.
- Mélanger et centrifuger à 12000 rpm pendant quelques secondes (centrifugeuse biofuge A).
- Incuber à 42°C pendant 60 minutes.
- Stocker l'échantillon à -20°C.

2.4. PCR.

(PTC 100, MJC research).

Conditions expérimentales (programmation de l'appareil PCR) :

température de dénaturation : 95°C pendant 1 minutes.

température d'hybridation : 50°C pendant 1 minutes.

Température de synthèse : 72°C pendant 3 minutes.

recommencer ce cycle 34x.

72°C pendant 10 minutes.

2.4.1. Première PCR.

Pour un volume total de 50 μ l :

1 μ l de cDNA.

5 μ l de tampon 10x.

2 μ l de dNTP 2.5 mM.

40 μ l d'eau (*RNAase free*).

1 μ l de *primer left*.

1 μ l de *primer right*.

1 μ l de *Taq polymerase* (1 u/ μ l; boehringer mannheim).

2.4.2. Deuxième PCR.

Pour un volume total de 50 μ l :

5 μ l du mélange de la première PCR.

5 μ l de tampon 10x.

2 μ l de dNTP 2.5mM.

35 μ l d'eau (*RNAase free*).

1 μ l de *primer left*.

1 μ l de *primer right*.

1 μ l de *Taq polymerase* (1 u/ μ l; boehringer mannheim).

2.5. Extraction d'ADN provenant d'un gel d'agarose.

Solutions :

TAE 10x (pH 7) : tris, 120 mM; NaAc, 60 mM; EDTA, 3 mM.

TE (pH 7.6) : tris, 10 mM; EDTA, 1 mM.

Gel d'agarose 1% :

1 g d'agarose/100 ml

1 µl de bromure d'étidium.

Voltage de 90 mV pendant 45 minutes

- Faire migrer les échantillons sur un gel d'agarose 1%.
- Découper la membrane de nitrocellulose (NA45) afin de couvrir complètement la largeur de la bande que l'on désire extraire. Les plonger dans le tampon d'électrophorèse : TAE 1x .
- A l'aide d'un scalpel, faire une fente dans le gel à proximité de la bande que l'on désire extraire.
- Placer les pièces de NA45 dans la fente, refaire migrer la bande jusqu'à ce qu'elle soit sur le papier. Vérifier aux U.V. le bon transfert de la bande sur le NA45.
- Si elle se trouve sur le papier, enlever le papier NA45 et le rincer dans du tampon TE. Rapidement, le mettre dans un eppendorf contenant 0.4 ml de NaCl 1 M et de l'arginine 50 mM (pH doit être compris entre 9 et 10).
- Incuber l'eppendorf à 70°C pendant 1 heure afin d'éluier la bande.
- Enlever le papier et ajouter 2.5 volume d' éthanol (stock -20°C).
- Laisser 1 nuit à -20°C.
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Enlever prudemment le surnageant.
- Laver le culot avec de l'éthanol 80% (stock -20°C).
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Enlever le surnageant.
- Resuspendre le culot dans un volume minimal d'eau (*RNAase free*).
- Stocker l'échantillon à -20°C.

2.6. Enlever les "A" aux extrémités de l'insert et phosphorylation des fragments nucléiques (bouts francs).

(Kit Amersham, science)

- Dans un eppendorf :
 - x µl de l'échantillon PCR.
 - 0.5 µl de *T₄ DNA polymerase* (2 u).
 - 0.5 µl de kinase (4 u).
 - 2 µl du tampon L/K (ligase/kinase).
 - 2 µl de dNTP 2.5 mM.
 - y ml d'eau (*RNAase free*). Volume total étant de 20 µl.
- Incuber à 37°C pendant 15 minutes.
- Incuber à 75°C pendant 10 minutes.
- Laisser refroidir.

Matériels et méthodes

- Ajouter 1 volume en phénol/chloroforme.
- Vortexer.
- Centrifuger à 13000rpm, à 4°C pendant 5 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter $1/10$ de volume en NaAc 3M.
- Ajouter 3 volumes d'éthanol (stock -20°C).
- Incuber à -70°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Enlever le surnageant délicatement.
- Resuspendre le culot dans 10 µl d'eau (*RNAase free*).
- Stocker l'échantillon à -20°C

2.7. Restriction enzymatique.

2.7.1. Plasmide.

Restriction avec SmaI.	Restriction avec XbaI et HindIII.
<ul style="list-style-type: none">- Dans un eppendorf, ajouter :<ul style="list-style-type: none">1 µg de SK⁺ (plasmide).x µl d'eau (<i>RNAase free</i>). Volume total étant de 20 µl.2 µl du tampon de réaction adéquat.2 µl de SmaI (Gibco Brl).- Incuber à 30°C pendant 2 heures.- Stocker l'échantillon à -20°C	<ul style="list-style-type: none">- Dans un eppendorf, ajouter :<ul style="list-style-type: none">1 µg de SK⁺ (plasmide).x µl d'eau (<i>RNAase free</i>). Volume total étant de 20 µl.2 µl du tampon de réaction adéquat.1 µl de XbaI (Gibco Brl).1 µl de HindIII (Gibco Brl).- Incuber à 37°C pendant 90 minutes.- Stocker l'échantillon à -20°C

2.7.2. Insert.

Restriction avec XbaI et HindIII.
<ul style="list-style-type: none">- Dans un eppendorf, ajouter :<ul style="list-style-type: none">x µl de l'insert.y µl d'eau (<i>RNAase free</i>). Volume total étant de 20 µl.2 µl du tampon de réaction adéquat.1 µl de XbaI (Gibco Brl).1 µl de HindIII (Gibco Brl).- Incuber à 37°C pendant 90 minutes.- Stocker l'échantillon à -20°C

2.7.3. Elimination des enzymes de restriction.

Solution :

TE (pH 7.6) : tris, 10 mM; EDTA, 1 mM.

Matériels et méthodes

- Au mélange de restriction, ajouter 180 μ l de TE.
- Ajouter 200 μ l de phénol/chloroforme.
- Vortexer.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 3 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter $1/10$ en volume de NaAc 3M + 2.5 volumes en éthanol.
- Incuber à -70°C pendant 1 heure.
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Enlever l'éthanol.
- Sécher le culot sous vide au *Speed Vac* (Heto VR-1).
- Resuspendre le culot dans 10 μ l d'eau (*RNAase free*).
- Stocker l'échantillon à -20°C .

2.8. Déphosphorylation du plasmide.

(kit Gibco Brl)

- 500 ng de SK⁺ (plasmide).
- 0.25 unité de CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase).
- 10 μ l du tampon de déphosphorylation 10x.
- x μ l d'eau (*RNAase free*). Volume total étant de 100 μ l.
- Incuber à 50°C pendant 1 heure.
- Incuber à 75°C pendant 10 minutes.
- Laisser refroidir.
- Ajouter 1 volume en phénol/chloroforme.
- Vortexer.
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 5 minutes.
- Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter $1/10$ de volume en NaAc 3M.
- Ajouter 3 volumes d'éthanol (stock -20°C).
- Incuber à -70°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes.
- Enlever le surnageant délicatement.
- Resuspendre le culot dans 10 μ l d'eau (*RNAase free*).
- Stocker l'échantillon à -20°C .

2.9. Ligation.

- Suivant le rapport SK⁺ (plasmide)/insert :
 - x pmoles de SK⁺ restreint.
 - y pmoles de l'insert restreint.
 - z ml d'eau (*RNAase free*). Volume total étant de 20 μ l.
 - 2 μ l du tampon de ligation 10x.
 - 1 μ l de l'enzyme : T₄ DNA ligase (Boehringer).
- 16 heures à 16°C .
- Stocker l'échantillon à -20°C .

2.10. Isolement de plasmides (mini-prep).

- Centrifuger 1.5 ml de suspension bactérienne à 13000 rpm, à 4°C pendant 2 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A). Eliminer le surnageant.
- Recommencer cette opération 2x.
- Ajouter au culot 150 µl d'une solution de glucose, 50 mM; tris, 25 mM; EDTA, 10 mM (stock 4°C) + lysozyme (4 mg/ml).
- Resuspendre le culot bactérien le plus rapidement possible.
- Incuber dans la glace pendant 5 minutes.
- Dénaturer l'ensemble de l'échantillon avec 300 µl de NaOH 0.2 M (stock 4°C) + SDS 0.1% (ajouter le SDS juste avant son utilisation).
- Incuber dans la glace pendant 5 minutes.
- Ajouter 150 µl d'acétate de potassium 3M, acide acétique glacial 10% (stock 4°C). Vortexer et incuber dans la glace pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes (centrifugeuse heraeus biofuge A).
- Récupérer le surnageant.
- Au surnageant, rajouter 400 µl de phénol/chlorophorme/alcool isoamylique (25:24:1).
- Vortexer.
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 2 minutes.
- Enlever la phase aqueuse.
- Ajouter à la phase aqueuse 1 ml d'éthanol (stock -20°C) et incuber à -70°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes.
- Sécher le culot sous vide au *Speed Vac* (Heto VR-1).
- Resuspendre le culot dans un volume minimal d'eau (*RNAase free*).
- Stock -20°C.

2.11. Obtention d'*E. Coli* électrocompétentes.

- Placer la culture de cellules (souche XL-1 Blue) dans la glace pendant 15 à 30 minutes.
- Récolter les bactéries par centrifugation à 4000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant.
- Laver les bactéries une première fois avec 1 l d'eau (stock 4°C).
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes.
- Laver le culot une deuxième fois avec 150 ml d'eau (stock 4°C).
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes.
- Resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10%.
- Centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes.
- Resuspendre le culot dans 2 à 3 ml de glycerol10%.
- Faire des aliquotes de 100 µl.
- Stocker à -70°C.

2.12. Electrotransformation.

Milieu SOC :

volume de 50 ml : glucose 20 mM (calculer pour 100 ml). Filtrer sur filtre millipore 0.22 µm.

volume de 50 ml : bactotryptone 2%; extraits de levure 0.5%; NaCl, 10 mM; KCl, 2.5 mM; MgCl₂, 10 mM; MgSO₄, 10 mM (calculer pour 100 ml).

Autoclaver.

Mélanger stérilement les 2 solutions avant son utilisation.

- Placer la cuvette d'électroporation dans la glace.
- Ajouter 1 µl du mélange de ligation à 100 µl de suspension de bactéries électrocompétentes.
- Transvaser le mélange dans la cuvette.
- Maintenir dans la glace pendant 5 minutes.
- Electroporer dans les conditions suivantes : 25 µF; 12.5 kV/cm et 200 ohms au moyen d'un *Gene pulser* (Biorad) équipé d'un *pulse controller* et de capacitances additionnelles.
- Ajouter le plus rapidement possible 1 ml de SOC (stock à température ambiante).
- Placer la cuvette à 37°C pendant 1 heure.
- Etaler les bactéries sur boîte de Pétri contenant : milieu LB + 100 µl de Ampicilline (10 mg/ml) + 40 µl d'IPTG 100 mM + 40 µl d'X-GAL 2%.
- Incuber ces boîtes pendant 1 nuit dans une étuve à 37°C.

Remarques :

Test de viabilité des électrocompétentes électroporées : électroporation de 100 µl de cellules électrocompétentes. Etaler ces 100 µl sur boîte de Pétri : LB agar + tétracycline : 60 µl/boîte (5 mg/ml).

Test de viabilité des cellules électrotransformées : électroporation de 100 µl de cellules électrocompétentes + 10 ngr de SK⁺ (plasmide). Etaler ces 100 µl sur boîte de Pétri : LB agar + ampicilline : 100 µl/boîte (10 mg/ml).

Test de viabilité des cellules électrocompétentes non électroporées : étaler 100 µl de cellules électrocompétentes non électroporées : LB agar + tétracycline : 60 µl/boîte (5 mg/ml).

2.13. Dosage de l'ADN par fluorimétrie.

Principe :

l'ADN est dosé au moyen d'un agent intercalant : l'HOECHST 33258. Ce dernier s'intercale spécifiquement entre les bases A et T.

Solution :

TNE 10x : tris, 10 mM; EDTA, 1 mM; NaCl, 100 mM (à filtrer sur Millipore 0.22µm).

HOECHST : 10 mg/ml.

Matériels et méthodes

Echelle :

Pour doser de 10 à 500 ng d'ADN, il faut de l'HOECHST à une concentration finale de 0.1 µg/ml (échelle 100); pour doser de 100 à 1000 ng d'ADN, il faut une concentration finale en HOECHST de 1 µg/ml (échelle 1000).

- Allumer l'appareil (hoefer) ½ heure avant son utilisation.
- Constituer une solution stock :
 - soit de TNE 1x + 5 µl de HOECHST 33258 (pour l'échelle 1000).
 - soit de TNE 1x + 0.5 µl de HOECHST 33258 (pour l'échelle 100).
- Réglage du zéro :
 - placer 2 ml de TNE 1x dans la cuvette.
 - réglage de l'appareil sur 0.
- Réglage de l'échelle :
 - pour l'échelle 1000 : utiliser une solution de calibration contenant 1000 ng/µl d'ADN de thymus de veau.
 - pour l'échelle 100 : utiliser une solution de calibration contenant 100 ng/µl de thymus de veau.
 - Introduire 2 ml de TNE 1x + 2 µl de la solution de *calf thymus* adéquate dans la cuvette.
 - réglage de l'appareil sur 100 ou 1000 suivant l'échelle utilisée.
- Toujours homogénéiser par inversion avant le réglage.
- Répéter 2x le réglage du zéro et de l'échelle.
- Ajouter à 2 ml de TNE 1x 2 µl de l'échantillon à doser.
- Lire la valeur indiquée. Celle-ci est exprimée en ng/µl.

2.14. Séquençage.

(*Circumvent phototope kit Biolab*)

2.14.1. Réaction de séquençage.

Conditions expérimentales (programmation de l'appareil PCR MJC Research, Inc, PTC100) :

température de dénaturation : 95°C pendant 20 secondes

température de synthèse : 55°C pendant 1 minute

température d'élongation : 72°C pendant 1 minute

Répéter ce cycle 29x

température finale 18°C

- Prendre 4 tubes PCR et les marquer A, G, C et T.
- Ajouter 3 µl de mix (*circumvent deoxy/dideoxy*) A dans le tube A. Faire la même chose pour les mix (*circumvent deoxy/dideoxy*) C, G, T.
- Dans un eppendorf ajouter :
 - 0.02 pmoles d'ADN.
 - 2 µl (1.2 pmoles) de *biotin primer*.
 - 1.5 µl de *circumvent buffer* 10x.
 - 1 µl de triton X-100 30x.
 - x µl d'eau distillée. Volume total étant de 14 µl.
 - Mélanger délicatement.
- Ajouter au mix 1 µl de *DNA polymerase*.

Matériels et méthodes

- Immédiatement, ajouter 3.2 µl du mix dans les tubes A, C, G, T.
- Utiliser l'appareil PCR.
- A la fin du programme, ajouter dans tous les tubes 4 µl de STOP *loading dye solution*.

2.14.2. Gel de séquençage.

Couler un gel de polyacrylamide 6% entre les 2 plaques préalablement silanisée.

2.14.3. Transfert gel de séquençage.

- Préparer avant la fin de la migration des échantillons (6 clones à séquencer) :
 - 8 feuilles Wattman n°3 de 16x30 cm.
 - 1 feuille Wattman n°3 de 30x41 cm.
 - 2 feuilles Wattman n°3 de 18x35 cm.
 - 1 membrane de nylon de 16x30 cm.
- A la fin de la migration, couper la source de tension et vider le compartiment supérieur au moyen de la vanne latérale.
- Enlever les plaques de la cuve, enlever le peigne et les *spacers*.
- Au moyen d'une petite spatule, décoller délicatement les plaques l'une de l'autre (le gel reste attaché à la grande plaque).
- Placer la feuille de 30x41 cm sur le gel en tapotant légèrement sur la feuille. Enlever délicatement la feuille sur laquelle le gel adhère.
- Mettre 4 feuilles de 16x30 cm et la membrane de nylon dans du tampon TBE 0.5x.
- Empiler 4 feuilles de 16x30 cm imprégnées de TBE 0.5x et placer la feuille-gel sur ces 4 feuilles (bien délimiter la zone de migration des échantillons).
- Marquer la membrane de nylon imprégnée de TBE 0.5x et la placer délicatement sur le gel de séquençage (éviter la formation de bulles).
- Recouvrir la membrane de nylon avec 4 feuilles de 16x30 cm sèches et placer la deuxième plaque de verre par dessus l'empilement.
- Laisser reposer pendant 1 heure à température ambiante.
- Prélever la membrane de nylon et la laisser sécher à l'air libre posée sur une feuille Whattmann de 18x35 cm (la face ADN n'est pas en contact avec la feuille) pendant 30 minutes à température ambiante.
- Sècher la membrane de nylon à 80°C pendant 15 minutes (entre 2 feuilles de 18x35 cm).
- Fixer l'ADN à la membrane de nylon aux U.V. pendant 4 minutes.
- Placer la membrane de nylon dans un plastique pour la révélation.

2.14.4. Révélation du gel de séquençage (kit-lumigen).

- Incuber la membrane de nylon pendant 5 minutes avec 50 ml de solution de saturation (pH 7.2; NaCl, 125mM; Na₂HPO₄.H₂O, 8 mM; SDS, 173 mM; stock 25°C) sous légère agitation et à température ambiante.
- Enlever la solution de saturation et ajouter 25 ml de la solution de saturation + 25 µl de la solution stock streptavidine (solution finale à 1 µg/ml). La streptavidine est préparée sous forme de solution stock 1000x concentrée dans le tampon S

Matériels et méthodes

(pH 7.2 ; tampon phosphate, 0.01 M; NaCl 0.15 M; azide de Na, 0.05%; stock 4°C). Incuber à température ambiante pendant 5 minutes, sous légère agitation.

- Laver la membrane de nylon avec 2x250 ml de solution de saturation diluée 10x pendant 2x5 minutes à température ambiante et sous légère agitation.
- Laver la membrane de nylon avec 2x250 ml de la solution de lavage (solution 10x : pH 9.5; tris, 100 mM; NaCl, 100 mM; MgCl₂, 10 mM) à température ambiante pendant 2x5 minutes et sous légère agitation.
- Ajouter 12.5 ml de tampon de détection et 125 µl de solution de lumigen-PPD et incuber 5 minutes à température ambiante sous légère agitation.
- Eliminer un maximum de la solution de détection en veillant à ne pas endommager la membrane de nylon et fermer le sachet en plastique.
- Placer la membrane de nylon dans une cassette d'autoradiographie et attendre 20 minutes avant d'exposer la membrane à une pellicule photo.
- Exposer le film pendant un minimum de 20 minutes à température ambiante.

2.14.5. Autoradiographie.

- Placer le film-photo dans le révélateur pendant 2 minutes.
- Rincer le film-photo dans l'eau pendant quelques secondes.
- Placer le film-photo dans le fixateur pendant 2 minutes.
- Rincer le film-photo abondamment sous eau courante et laisser sécher à l'air libre.

BIBLIOGRAPHIE.

- ARMSTRONG F., BLATT M.R. (1995). Evidence for K⁺ channel control in *Vicia* guard cells coupled by G proteins to a 7TMS receptor mimetic. *The plant journal* **8** (2) : 187-198.
- BACHMANN M., McMICHAEL R.W., HUBER J.L., KAISER W.M., HUBER S.C. (1995). Partial purification and characterisation of the calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Plant physiol.* **108** : 1083-1091.
- BARRIT G.J. (1994) Communication within animal cells. Chapter III : The plasma membrane receptors and GTP-binding proteins. Oxford science publications.
- BENNET M., GREEN H., WARD S., SCHULZ B., FELDMANN K.A. (1994). Molecular characterisation of the AUX1 gene of *Arabidopsis*. *Communication intercellulaire : biotechnologie des récepteurs membranaires.*
- BERRIDGE M.J. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* **361** : 315-325.
- BREVIARIO D., MORELLA L., GIANI S. (1995). Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. *Plant molecular biology* **27** : 953-967.
- BURNS D.J., BELL R.M. (1991). Protein kinase C contains two phorbols ester binding domains. *The journal of biological chemistry* **266** (27) : 18330-18338.
- CARPENTER G. (1992). Receptor tyrosine kinase substrates : src homology domains and signal transduction. *The FASEB journal* **6** : 3283-3289.
- CAUSIER B. E., MILLNER P. A. (1996). G protein-regulated phospholipase D : another piece in the plant cell signalling jigsaw. *Trends in plant science* **1** (6) : 168-170.
- CHARDIN P. (1994). Domaines SH2 et SH3 : un nouveau paradigme par la transmission du signal. *Médecine/Sciences* **10** : 709-712.
- COSIO G.E., FREY T., VERDUYN R., van BOOM J., EBEL J. (1990). High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS* **271** : 223-226.
- DARNELL, LODISH, BALTIMORE (1993). *Biologie moléculaire de la cellule*, deuxième édition. De Boeck University.
- DEKKER L.V., PARKER P.J. (1994). Protein kinase C-a question of specificity. *TIBS* **19** : 73-77.

Bibliographie

- DOLPH P.J., MAN-SON-HING H., YARFITZ S., COLLEY N.J., DEER J.R., SPENCER M., HURLEY J.B., ZUKER C.S. (1994). An eye-specific G β subunit essential for termination of the phototransduction cascade. *Nature* **370** : 59-61.
- GONZALES F.A., SETH A., RADEN D.L., BOWMAN D.S., FAY F.S., DAVIS R.J. (1993). Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *The journal of cell biology* **122** (5) : 1089-1101.
- HARMON A.C., McCURDY D.W. (1990). Calcium-dependent protein kinase and its possible role in the regulation of the cytoskeleton. *Currents topics in plant biochemistry and physiology* **9** : 119-128.
- HIBERT M.F., HOFLACK J., TRUMPP-KALLMEYER S., BRUINVELS A. (1993) Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G. *Médecine/sciences* **9** : 31-40.
- HONDA C., KOMATSU S., HIRANO H. (1993). A calcium-and phospholipid-dependent protein kinase in soybean. *Phytochemistry* **35** (6) : 1407-1411.
- HSU C.-Y.J., HURWITZ D.R., MERVIC M., ZILBERSTEIN A. (1991). Autophosphorylation of the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor results in different effects on its tyrosine kinase activity with various peptide substrates. *The journal of biological chemistry* **266** (1) : 603-608.
- HUTTLY A. K., PHILLIPS A. L. (1995). Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant molecular biology* **27** : 1043-1052.
- INAGAKI M., YOKOKURA H., SAKOH T., HIDAKA H. (1987). Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature* **325** : 161-166.
- KAMADA Y., MUTO S. (1994). Protein kinase inhibitors inhibit stimulation of inositol phospholipid turnover and induction of phenylalanine ammonia-lyase in fungal elicitor-treated tobacco suspension culture cells. *Plant cell physiol.* **35** (3) : 405-409.
- KATAGIRI T., MIZOGUCHI T., SHINOZAKI K. (1996). Molecular cloning of a cDNA encoding diacylglycerol kinase (DGK) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **30** : 647-653.
- KAZIRO Y., ITOH H., KOZASA T., NAKAFUKU M., SATOH T. (1991). Structure and function signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. rev. biochem.* **60** : 349-400.
- LEFKOWITZ R. J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74** : 409-412.
- LEMMON M. A., SCHLESSINGER J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TiBS* **19** : 459-463.

Bibliographie

- LIBERT F., PARMENTIER M., LEFORT A., DINSART C., VAN SANDE J., MAENHAUT C., SIMONS M.-J., DUMONT J.E., VASSART G. (1989). Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* **244** : 569-572.
- LINDZEN E., CHOI J.H. (1995). A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant molecular biology* **28** : 785-797.
- MA H. (1994). GTP-binding proteins in plants : new members of an old family. *Plant Molecular Biology* **26** : 1611-1636.
- MASUDA T., KOMATSU S., HIRANO H. (1994). Protein kinase-catalysed protein phosphorylation in rice leaves. *Phytochemistry* **36 (5)** : 1147-1151.
- MAYER B.J., BALTIMORE D. (1993). Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends in cell biology* **3** : 8-13.
- MESSIAEN J., READ N. D., VAN CUTSEM P., TREWAVAS A. J. (1993). Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *Journal of cell science* **104** : 365-371.
- MESSIAEN J., VAN CUTSEM P. (1993). Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. *Plant cell physiol.* **34 (7)** : 1117-1123.
- MEESSIAEN J., VAN CUTSEM P. (1994). Pectic signal transduction in carrot cells : membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant cell physiol.* **35 (4)** : 677-689.
- MESSIAEN J. (1994). La transduction du signal chez les végétaux supérieurs en réponse à une attaque pathogène : identification de réponses membranaires, cytosoliques et nucléaires induites par des oligogalacturonides. Presses universitaires de Namur.
- MOLLEREAU C., PARMENTIER M., MAILLEUX P., BUTOUR J.-L., MOISAND C., CHALON P., CAPUT D., VASSART G., MEUNIER J.-C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters* **341** (1994) : 33-38.
- MU J.-H., LEE H.-S., KAO T.-H. (1994). Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *The plant cell* **6** : 709-721.
- NEER E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins : Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80** : 249-257.
- OHNO S., KAWASAKI H., IMAJOH S., SUZUKI K. (1987). Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature* **325** : 161-166.

Bibliographie

- OSADA S., MIZUNO K., SAIDO T.C., AKITA Y., SUZUKI K., KUROKI T., OHNO S. (1990). A phorbol ester receptor protein kinase η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *The journal of biological chemistry* **265** (36) : 22434-22440.
- PANAYOTOU G., WATERFIELD M.D. (1993). The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinases. *Bioessays* **15** (3) : 171-177.
- PARMENTIER M., LIBERT F., MAENHAUT C., LEFORT A., GERARD C., PERRET J., VAN SANDE J., DUMONT J. E., VASSART G. (1989). Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* **246** : 1620-1622.
- PITCHER J.A., PAYNE E. S., CSORTOS C., DEPAOLI-ROACH A.A., LEFKOWITZ R.J. (1995). The G-protein-coupled receptor phosphatase : A protein phosphatase type 2A with distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Biochemistry* **92** : 8343-8347.
- RAYMOND J.R. (1995). Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *The American Physiological Society* : F141-F156
- REN H., STILES G. L. (1994). Posttranscriptional mRNA processing as a mechanism for regulation of human A_1 adenosine receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 4864-4866.
- ROBERTS D.M., OH S.H., BESL L., WEAVER C.D., STACEY G. (1990). Attenuation of calmodulin-dependent NAD kinase activation by posttranscriptional methylation. *Currents topics in plant biochemistry and physiology* **9** : 67-84.
- SIMON M.I., STRATHMANN M.P., GAUTAM N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252** : 802-808.
- STERNWEISS P.C., SMRCKA A.V. (1992). Regulation of phospholipase C by G proteins. *TiBS* **17** : 502-506.
- STONE J.M., WALKER J.C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant physiol.* **108** : 451-457.
- TAYLOR S.S., KNIGHTON D.R., ZHENG J., SOWADSKI J.M., GIBBS C.S., ZELLER M.J. (1993). A template for the protein kinase family. *TiBS* **18** : 84-89.
- WALKER J.C., ZHANG R. (1990). Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* **365** : 743-745.
- YANG W., BURKHART W., CAVALLIUS J., MERRICK W.C., BOSS W.F. (1993). Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *The journal of biological chemistry* **268** (1) : 392-398.