



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de la voie de l'AMPC chez la chicorée industrielle. Production de sondes immunologiques contre le facteur de transcription CREB

Draye, Mallory

Award date:
1998

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.

12 JUNE 1998
SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
100 de Bruxelles, CI
11 - 5000 - NAMUR

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VOIE DE L'AMP_c CHEZ LA CHICOREE
INDUSTRIELLE. PRODUCTION DE SONDAS IMMUNOLOGIQUES CONTRE LE
FACTEUR DE TRANSCRIPTION CREB**

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

Draye Mallory
Juin 1998

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72 44 18 - Téléfax: + 32(0)81.72 44 20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Contribution à l'étude de la voie de l'AMPC chez la chicorée industrielle.
Production de sondes immunologiques contre le facteur de transcription
CREB**

DRAYE Mallory

Résumé

L'AMPC est une molécule signalétique importante chez les organismes vivants. Malgré l'identification des intermédiaires de cette voie chez plusieurs espèces végétales, un lien direct entre la production d'AMPC et l'activation de gènes par des facteurs de transcription CREB-like dépendant de celui-ci n'a pas encore été démontré chez les plantes.

Lors de ce travail, deux fragments de protéines b-ZIP végétales, p480 et p540, ont été surexprimés, après clonage des inserts CREB480 et CREB540 codant pour ceux-ci dans le vecteur d'expression pET-15b introduit dans *E.coli*. Ces fragments protéiques ont été purifiés par électro-élution et ensuite injectés à des lapins. Les polysérums prélevés après plusieurs rappels ont été testés en dot blot dans un premier temps afin de vérifier la présence d'anticorps contre les protéines d'intérêt. Dans un deuxième temps, ces polysérums ont été testés, par western blot, d'abord sur les protéines totales d'*E.coli*, puis sur les protéines de racine et de feuilles de chicorées industrielles.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

Promoteur: P. Van Cutsem

Directeur de mémoire: J. Messiaen

Je tiens à remercier, en premier lieu et tout particulièrement, le professeur Van Cutsem pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour ses nombreux conseils et encouragements tout au long de ce mémoire.

Un grand merci à Johan pour sa patience et sa disponibilité sans pareille, pour ses dessins et son humour.

Merci à "Mac" Pierre "Gyver" pour sa bonne humeur à toute épreuve et pour ses nombreux coups de main. Merci à (l'honorable) Laurent et à Stéphanie pour leurs sourires. Merci aux autres membres du laboratoire.

Merci à Cindy, coéquipière modèle et motivée, à l'aide plus que précieuse.

Merci à mes parents, à Leslie, à toute ma famille pour leur soutien quotidien, leur aide (précieuse) et leur immense patience.

Merci à mes amis de toujours, Benoit, Daniel, Lionel, Rudy et Xavier pour m'avoir supporté et soutenu depuis de longues (mais inoubliables) années.

Merci à mes amis plus récents, mais tout aussi chers, Fanny, Caroline, Emmanuel, Yanick, Johanne, Caroline, David et Christophe.

Merci à mes amis futurs.

ABREVIATIONS

A	Adénosine
aa	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampiciline
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Amp^r	Marqueur de résistance à l'ampiciline
APS	Amonium persulfate
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adénosine triphosphate
β-ME	β-mercaptoéthanol
C	Cytidine
CAP	Catabolite gene activator protein
CBP	CREB binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
G	Guanosine
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
IPTG	Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Milieu de Luria-Bertani
pb	Paire de bases
PAGE	Polyacrylamide gel
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante de la voie des phosphoinositides
PM	Poids moléculaire

RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
T	Thymidine
TEMED	N,N,N',N' -Tétraméthyl Ethylène Diamine
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Tween	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
X-Gal	5-Bromo 4-Chloro 3-indoyl, β -D galactopyranoside

Table des matières

I. Introduction

1. Introduction générale	10
2. La voie de l'AMPC	11
2.1. Aperçu général de cette voie	12
2.2. Les différents protagonistes de cette voie	13
2.2.1. Le complexe ligand-récepteur.....	13
2.2.2. Les protéines G.....	14
2.2.3. L'adénylate cyclase.....	15
2.2.4. La protéine kinase A (PKA).....	16
2.2.5. Régulation du taux d'AMPC dans les cellules.....	18
2.2.5.1. Les phosphodiésterases.....	18
2.2.5.2. Les phosphatases.....	19
2.2.6. Le facteur de transcription CREB.....	20
2.2.6.1. Structure du facteur de transcription CREB.....	20
2.2.6.2. Régulation du facteur de transcription CREB.....	22
2.2.6.3. Protéines interagissant avec CREB lors de l'activation de la transcription.....	23
3. La voie de l'AMPC chez les végétaux	23
3.1. L'AMPC chez les végétaux	23
3.2. Les intermédiaires de la voie de l'AMPC chez les végétaux	24
3.2.1. Les protéines G.....	24
3.2.2. L'adénylate cyclase.....	25
3.2.3. La PKA.....	26
3.2.4. Le facteur CREB.....	26
3.3. Fonction signalétique de l'AMPC chez les végétaux	27

II. Buts du mémoire

Buts du mémoire	29
------------------------------	-----------

III. Matériel et Méthodes

1. Méthodes relatives au clonage des inserts	31
1.1. Culture d'<i>Escherichia coli</i>	31
1.2. Préparation de l'ADN plasmidique d'<i>Escherichia coli</i>	31

1.2.1.	Mini-préparation d'ADN	31
1.2.2.	Midi-préparation d'ADN plasmidique.....	32
1.3.	Dosage d'ADN au spectrophotomètre UV/visible	34
1.4.	Réaction de PCR.....	34
1.5.	Purification de l'ADN amplifié (QIAquick Nucleotid Removal Kit, QIAGEN).....	35
1.6.	Electrophorèse d'ADN (gel horizontal).....	36
1.7.	Extraction d'ADN d'un gel d'agarose (kit QIAEX II)	37
1.8.	Restriction	38
1.9.	Ligation	39
1.10.	Transformation et sélection	39
1.10.1.	Transformation des bactéries TOP10 (kit One Shot)	39
1.10.2.	Préparation de cellules électrocompétentes.....	40
1.10.3.	Electro-transformation	41
1.10.4.	Sélection des bactéries recombinantes : test lac Z.....	41
1.11.	Réaction de séquençage par PCR.....	42
1.11.1.	Pré-amplification de l'insert avec les amorces spécifiques du vecteur	42
1.11.2.	Purification du produit d'amplification (QIAquick Nucleotide Removal Kit).....	43
1.11.3.	Réaction de séquençage	44
1.11.4.	Purification de l'ADN séquencé	44
2.	Méthodes relatives à l'analyse des protéines	45
2.1.	Induction de l'expression de l'insert	45
2.2.	Extraction des protéines des bactéries BL-21 (DE3).....	45
2.3.	Extraction des protéines de chicorée	46
2.4.	Electrophorèse SDS-PAGE (méthode de Laemmli).....	47
2.4.1.	Gel.....	47
2.4.2.	Visualisation des protéines.....	49
2.5.	Elution des protéines à partir d'un gel SDS-PAGE	50
2.6.	Purification sur résine His-Bind (Novagen) et digestion à la thrombine	51
2.7.	Immunsation des lapins	52
2.8.	Dot blot et Werstern blot.....	53
2.8.1.	Epuisement d'un polysérum.....	53
2.8.2.	Dot blot	53
2.8.3.	Transfert de protéines d'un gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose.....	54
2.8.4.	Visualisation des protéines transférées.....	55
2.8.4.1.	Encre de Chine.....	55
2.8.4.2.	Ponceau S.....	55
2.8.5.	Western blot	56

IV. Résultats et discussions

1.	Bref rappel des objectifs du mémoire.....	58
2.	Les séquences CREB.....	58

2.1.	Résumé des travaux antérieurs	58
2.2.	Séquençage complet des deux clones	59
2.2.1.	CREB480	59
2.2.2.	CREB540	59
2.2.2.	Alignement multiple des séquences	60
3.	<i>Le clonage des séquences CREB dans pET-15b</i>	60
3.1.	Le vecteur pMOS	60
3.2.	Définition de nouvelles amorces	61
3.3.	Amplification par PCR et clonage dans le vecteur pMOS	62
3.3.1.	Vérification des clones de départ	62
3.3.2.	Amplification de CREB480 et CREB540 avec les amorces CR4, CR6 et CR7.....	63
3.3.3.	Ligation des inserts dans pMOS.....	64
3.3.4.	Sélection et analyse des transformants	64
3.3.5.	Séquençage.....	65
3.4.	Clonage dans le vecteur pET-15b	67
3.4.1.	Purification et restriction des séquence CREB480 et CREB540.....	67
3.4.2.	Clonage des inserts dans le plasmide pET-15b	68
3.4.2.1.	Purification du plasmide pET-15b.....	69
3.4.2.2.	Ligation des inserts dans le plasmide pET-15b.....	70
3.4.3.	Transformation des bactéries TOP10 avec le vecteur pET-15b contenant l'un des inserts	70
3.5.	Séquençage des inserts et vérification de la phase.....	71
3.6.	Passage en BL-21 (DE3).....	73
4.	<i>Expression des protéines p480 et p540</i>	74
4.1.	Induction à l'IPTG	74
4.2.	Purification partielle des protéines p480 et p540 par électro-élution	75
4.3.	Immunsation des lapins	75
5.	<i>Analyse des polyséras par dot blot et western blot</i>	75
5.1.	Dot blot.....	75
5.2.	Purification de p480 et de p540 sur résine His-Tag	77
5.3.	Digestion à la thrombine.....	77
5.4.	Western blot.....	78
5.4.1.	Western blot sur protéines d' <i>E.coli</i>	78
5.4.1.1.	Western blot contre les protéines totales d' <i>E.coli</i>	79
5.4.1.2.	Western blot contre les protéines purifiées et digérées avec la thrombine.....	79
5.4.2.	Western blot sur les protéines végétales.....	80

V. Conclusions générales et perspectives

1.	<i>Conclusions</i>	82
2.	<i>Perspectives</i>	82

I. Introduction

1. Introduction générale

Les cellules végétales perçoivent continuellement des stimulations en provenance du milieu extérieur ou en provenance d'autres cellules. Ces stimulations peuvent être des molécules particulières (hormones, facteurs d'avorulence, fragments de polysaccharides, peptides...) ou encore des facteurs abiotiques (la lumière, la gravité, l'ozone ou des polluants). Comme beaucoup de ces molécules ne peuvent pas passer la barrière que représente la membrane plasmique, un système de transduction du signal existe et permet à l'information d'arriver jusque dans la cellule et d'y provoquer une réponse adaptée. Ces stimulations, encore appelées messagers primaires, sont perçues à la surface de la cellule par un récepteur spécifique. Ce récepteur possède généralement un domaine extracellulaire qui permet de lier spécifiquement le messager primaire, un domaine transmembranaire et enfin un domaine intracellulaire pour transmettre l'information. Ce récepteur permet de relier l'extérieur et l'intérieur de la cellule. L'information est ensuite relayée par un messager secondaire à l'intérieur du cytoplasme. Ce messager secondaire intracellulaire va déclencher une cascade enzymatique qui aboutit à la transcription de gènes spécifiques adaptés à la stimulation initiale.

L'étude des voies de transduction du signal chez les plantes n'en est encore qu'à ses débuts. La plupart des études réalisées se sont basées sur les paradigmes de transduction du signal décrits chez les cellules animales et ont essayé de transposer ceux-ci chez les végétaux. Les plantes possèdent, par exemple, une voie des phosphoinositides quasi identique à celle retrouvée chez les animaux. Ceci n'est cependant pas vrai pour toutes les cascades de transduction du signal. Par exemple, la voie de l'acide arachidonique n'existe pas chez les plantes et est remplacée par la voie du méthyljasmonate. Les plantes possèdent également des mécanismes de transduction du signal différents des animaux, tels que la voie de l'acide salicylique ou la voie de l'éthylène.

Une voie en particulier, la voie de l'AMPC, a suscité et suscite toujours de nombreuses polémiques quant à son existence et son rôle physiologique chez les végétaux supérieurs. Longtemps considérée comme inutile chez les plantes, cette voie trouve progressivement un regain d'attention de la part de la communauté scientifique.

L'objectif du projet dans lequel s'inscrit le travail de ce mémoire est d'étudier le rôle physiologique des intermédiaires de la voie de l'AMPC. Nous allons, dans la suite

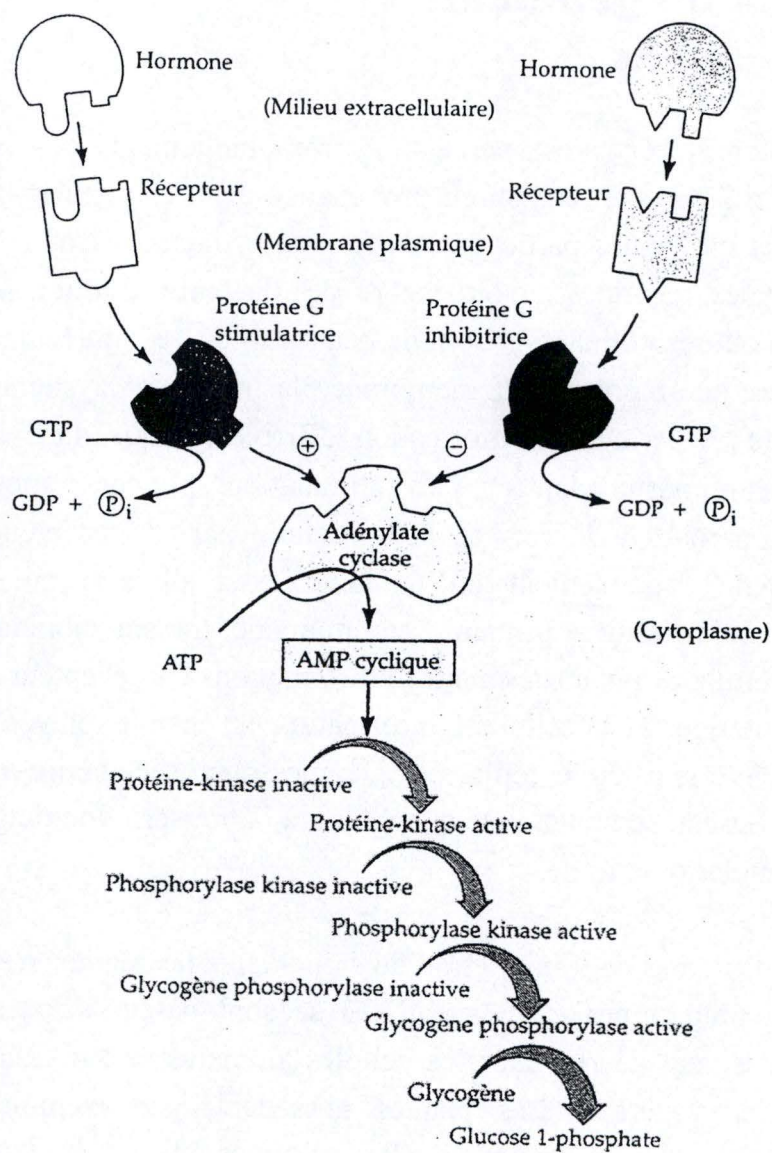


Figure 1 : Régulation de la glucogénolyse chez les animaux par la voie de l'AMPc

de cette introduction, détailler cette cascade chez les cellules animales et faire état des recherches actuelles menées dans le domaine végétal.

2. La voie de l'AMPc

L'AMPc est un messager secondaire clé au niveau des organismes vivants. On le connaît surtout chez les cellules animales où il joue un rôle important dans la différenciation des cellules ainsi qu'au niveau de leur développement.

Chez beaucoup de procaryotes, l'AMPc est synthétisé lorsque la concentration en glucose dans le milieu diminue. L'AMPc stimule alors la synthèse d'enzymes nécessaires pour le métabolisme des sucres différents du glucose tels le lactose, le maltose ou l'arabinose. Chez *E.coli*, l'opéron *lac*, nécessaire pour l'utilisation du lactose, est sous le contrôle d'une protéine de régulation, le répresseur *lac* (Calos, 1978; Rawn, 1990). La transcription de l'opéron *lac* est donc aussi sous la dépendance de la concentration en glucose dans le milieu. Lorsque la concentration en glucose dans le milieu diminue, la concentration en AMPc va augmenter dans la cellule. Celui-ci va pouvoir être capté par la protéine CAP (catabolite gene activator protein) pour former le complexe CAP:AMPc qui est capable de se fixer sur l'ADN et d'interagir avec l'holoenzyme d'ARN polymérase et ainsi activer la transcription de l'opéron *lac* (Darnell *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1991; Bolwell, 1995). Il n'y a pas de protéine kinase dépendante de l'AMPc décrite chez les procaryotes (Gancedo *et al.*, 1985).

Chez les eucaryotes, l'AMPc possède uniquement une fonction signalétique en jouant le rôle de second messenger. Chez les animaux, il intervient par exemple dans la régulation de la balance glycogénolyse/glyconéogenèse (*figure 1*) (Bolwell, 1995), dans la prolifération cellulaire, ce qui est également le cas chez les levures (Gancedo *et al.*, 1985), dans la contraction musculaire, dans la perméabilité membranaire (Dolphin, 1990; Haynes *et al.*, 1992) ou dans la régulation de différents canaux ioniques (Li *et al.*, 1994) (voir également tableau page 4).

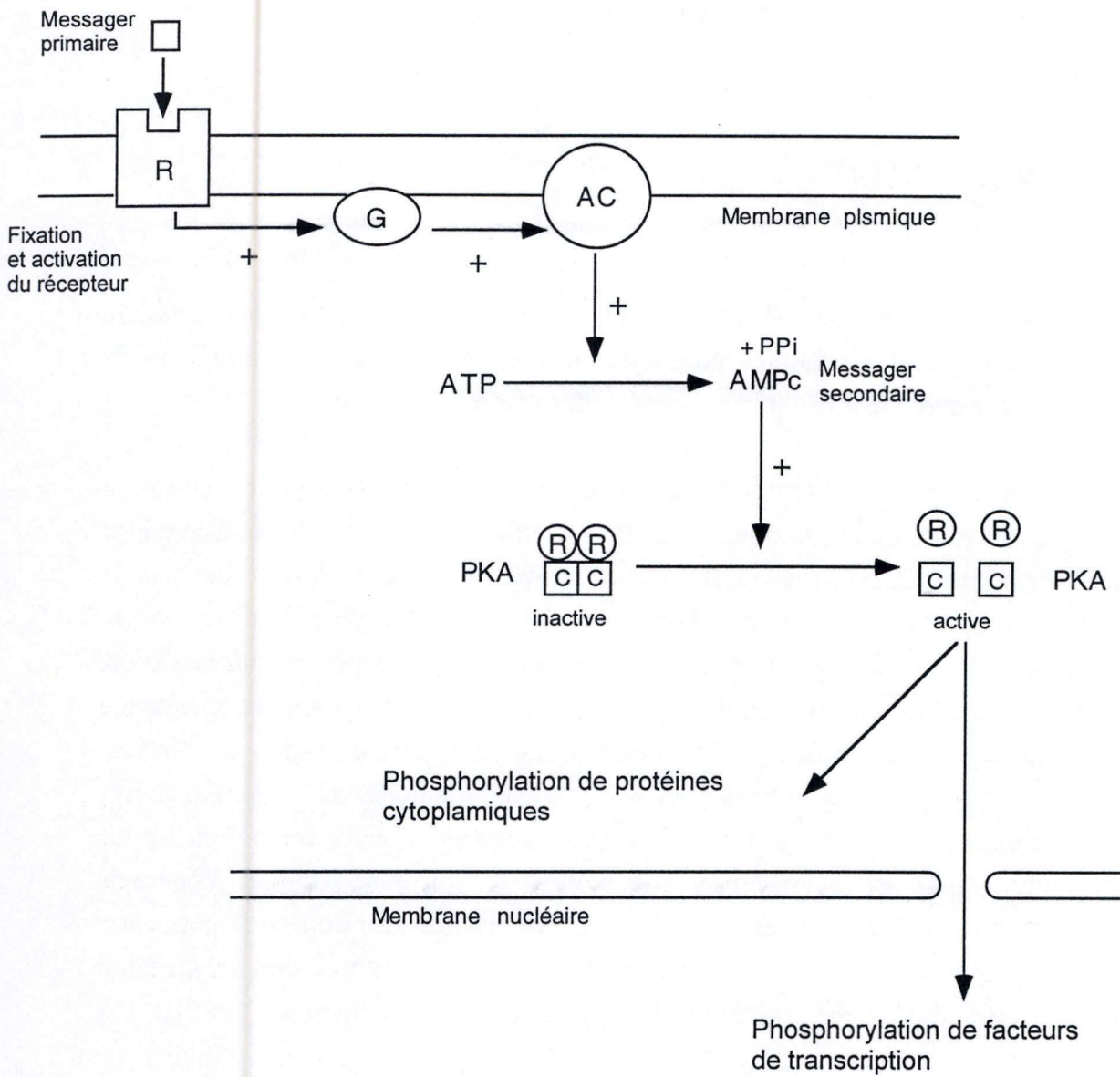


Figure 2 : Les différentes étapes de la voie de transduction du signal médiée par l'AMPc chez les cellules animales

2.1. Aperçu général de cette voie

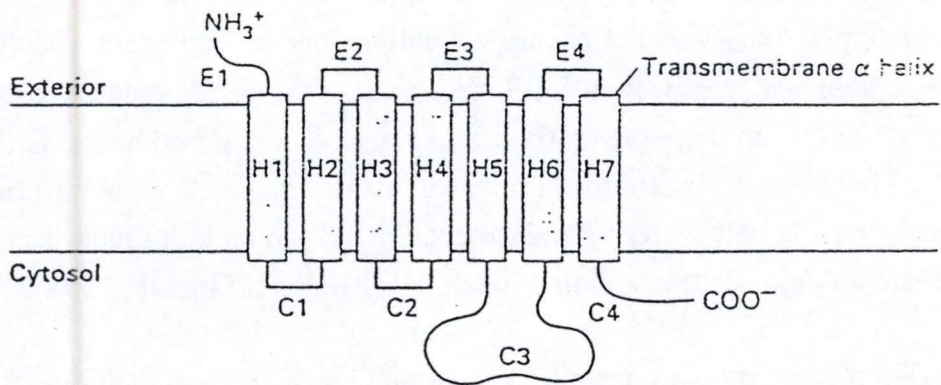
La voie de l'AMPc peut se diviser en 4 étapes principales: la fixation du ligand sur le récepteur, la production de l'AMPc, l'activation de la protéine kinase A (PKA) et du facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein) et enfin la transcription de gènes dépendant de l'AMPc (*figure 2*) (Berridge, 1985).

La première étape de cette voie consiste en la reconnaissance d'un ligand (une hormone par exemple) ou d'une molécule particulière par un récepteur spécifique à celle-ci. Ce récepteur est une protéine à 7 hélices α transmembranaires et possède deux domaines distincts, un domaine de fixation à l'hormone et un domaine de fixation à une protéine G hétérotrimérique dont la fonction est de transmettre une information, perçue à l'extérieur de la cellule, vers l'intérieur de la cellule en entraînant l'activation d'une ou de plusieurs voies de transduction du signal (Linder et Gilman, 1998).

La deuxième étape de la transduction du signal consiste en la synthèse d'AMPc à partir d'ATP. Cette synthèse se trouve sous le contrôle d'une adénylate cyclase membranaire qui, elle-même, se trouve sous le contrôle d'une protéine G.

L'étape suivante est l'activation de la PKA, une sérine/thréonine kinase directement activée par la liaison de 4 molécules d'AMPc. L'activation de cette enzyme entraîne une amplification intracellulaire du signal initial via différents effecteurs enzymatiques sans faire intervenir d'étape de transcription de gène. La PKA peut également phosphoryler un facteur de transcription particulier, appelé CREB (cAMP responsive element binding protein). La phosphorylation de ce facteur de transcription permet à ce dernier d'activer la transcription de gènes se trouvant sous le contrôle de domaine CRE (cAMP responsive element) (Darnell *et al.*, 1988; Rawn, 1990; Barritt, 1994).

L'ensemble de ces réponses cellulaires se trouve sous le contrôle de différents processus de régulation tels que l'inactivation du récepteur, l'inactivation de la protéine G, la destruction de l'AMPc par les phosphodiesterases et des interactions avec d'autres voies de transduction du signal (Darnell *et al.*, 1988; Barritt, 1994).



E1 - E4 = extracellular loops

H1 - H7 = transmembrane helices

C1 - C4 = cytosolic loops

Figure 3 : Structure des récepteurs intervenant dans la voie de l'AMPc chez les cellules animales

2.2. Les différents protagonistes de cette voie

2.2.1. Le complexe ligand-récepteur

Différentes molécules sont capables d'activer la voie de l'AMPc. Le tableau ci-dessous reprends quelques exemples d'hormones, facteurs de croissance et molécules capables de modifier la concentration en AMPc cytosolique des cellules animales (Barritt, 1994).

Agoniste	Type cellulaire	Réponse
Adrénaline (β) Adrénaline (β), Acétylcholine (M)	Muscle cardiaque Muscle lisse	} Modulation de la contraction musculaire
Glucagon (G_1), adrénaline (β_1)	Foie, rein et muscle cardiaque	Glycolyse et synthèse de glucose
Glucagon , glucose et acétylcholine Acétylcholine Adrénaline (β)	Cellule β pancréatique Cellule acinaire pancréatique Médullaire adrénaie	} Sécrétion d'hormones et de protéines
Adrénaline (β) 5-Hydroxytryptamine Vasopressine	Glande parotide Glande salivaire Rein	} Sécrétion d'ions et de fluide
Facteurs de croissance	Fibroblastes	Mitogenèse
ADP	Plaquettes sanguines	Changement morphologique et sécrétion

Le récepteur est une protéine transmembranaire avec trois domaines distincts aux fonctions différentes. Le premier domaine a pour fonction de fixer le ligand et est localisé au niveau de l'extrémité amino-terminale de la protéine. Le deuxième domaine comprend les 7 hélices α transmembranaires et participe à la spécificité du récepteur vis-à-vis du ligand. Certains domaines externes des hélices α participent, en effet, à la fixation du ligand en formant une poche hydrophobe. Elles assurent également l'ancrage du récepteur en membrane. Enfin, le troisième domaine, le domaine carboxy-terminal, est responsable de l'interaction entre le récepteur et la protéine G (*figure 3*) (Rawn, 1990; Barritt, 1994).

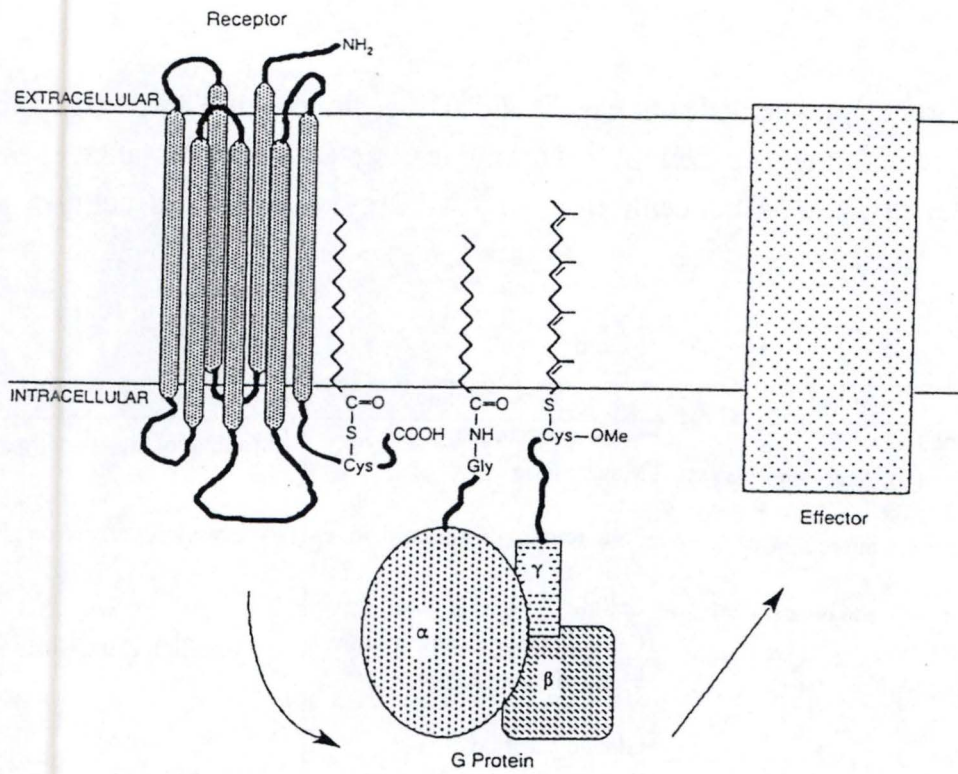


Figure 4 : Fixation des protéines G au niveau de la membrane plasmique

Un même récepteur peut activer des protéines G différentes, tout comme des récepteurs différents peuvent activer une même voie de transduction du signal (Barritt, 1994; Barritt, 1994). A ce premier niveau, une amplification du signal est alors possible. De plus un même récepteur peut activer deux voies de transduction différentes. Par exemple, un récepteur histamine H₂, caractérisé chez le rat, est couplé à la fois à l'adénylate cyclase et à une voie utilisant la concentration en calcium comme messenger secondaire (Delvalle *et al.*, 1992).

L'activation d'un récepteur nécessite généralement de faibles quantités de ligand. En présence de fortes concentrations en ligand, la plupart des récepteurs subissent assez rapidement un phénomène de désensibilisation qui se traduit soit par une impossibilité de transmettre un signal dans la cellule, soit par une disparition transitoire (endocytose) du récepteur de la surface de la cellule. Cette régulation évite à la cellule d'être hyperstimulée (Barritt, 1994; Housley et Milligan, 1997).

2.2.2. Les protéines G

Les protéines G sont un des éléments relais dans les voies de transduction du signal. Leur fonction est soit d'activer soit au contraire d'inhiber une voie de transduction du signal.

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques associées à la membrane et liant les nucléotides guanyliques. Elles sont, en effet, constituées de 3 sous-unités (α , β et γ) aux structures et fonctions différentes. La sous-unité α , responsable de la fixation du GDP et du GTP, possède un poids moléculaire allant de 39 à 52 kDa; la sous-unité β , un poids moléculaire de 35 à 36 kDa; et, la sous-unité γ un poids moléculaire de 10 kDa (Lambright *et al.*, 1996). Les protéines G font parties d'une famille génique qui comporte au moins 16 gènes différents codant pour la sous-unité α (Simon *et al.*, 1991), 6 pour la sous-unité β (Iniguez-Lluhi *et al.*, 1993) et de nombreux gènes qui codent pour la sous-unité γ (Simon *et al.*, 1991). L'association entre ces différents sous-unités permet un contrôle fin des réponses cellulaires face à des stimulations très diversifiées.

Deux des trois sous-unités sont attachées au niveau de la membrane plasmique, la sous-unité α étant myristoilée tandis que la sous-unité γ est géranylgéranylée (*figure 4*) (Spiegel *et al.*, 1991; Clapham, 1996).

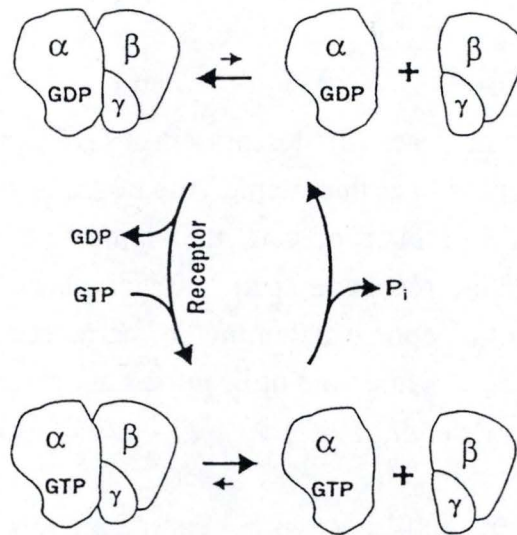


Figure 5 : Modèle de l'activation des protéines G

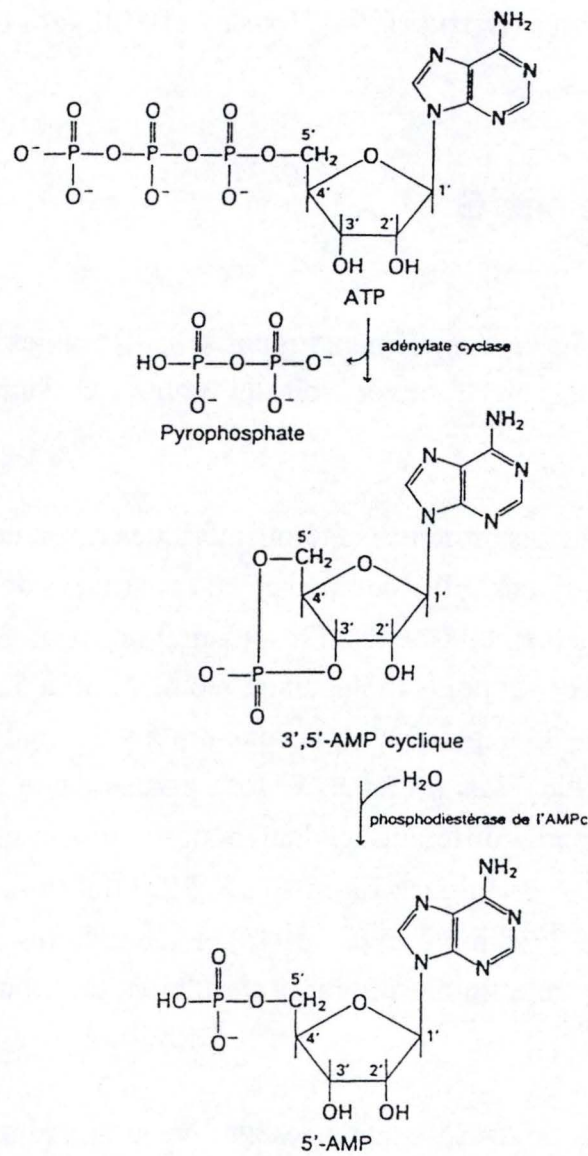


Figure 6 : Synthèse et dégradation de l'AMPc

Au repos, la sous-unité α de la protéine est associée à du GDP. Lors de la fixation d'un ligand sur un récepteur, ce dernier change de conformation et entre en interaction avec la protéine G. Ce changement de conformation entraîne le remplacement du GDP par du GTP au sein de la sous-unité α (*figure 5*). Celle-ci se dissocie alors des sous-unités β et γ et active l'adénylate cyclase (Linder et Gilman, 1998).

Un système d'autorégulation interne à la sous-unité α permet à la protéine G de retrouver sa configuration initiale inactive. La sous-unité α possède en effet une activité GTPase intrinsèque qui va hydrolyser le GTP en GDP par la perte d'un groupement phosphate. La sous-unité α , alors inactivée, se réassocie au complexe formé par les sous-unités β et γ , reconstituant ainsi une protéine G capable d'interagir de nouveau avec le récepteur.

Il existe deux types principaux de protéines G, les protéines G stimulatrices (G_s) et les protéines G inhibitrices (G_i). Comme son nom l'indique, la protéine G_s active l'adénylate cyclase et donc la production d'AMPc. Au contraire, la protéine G_i quant à elle, inhibe l'adénylate cyclase et diminue le taux de synthèse de l'AMPc. La combinaison de différentes protéines G (G_s et G_i) permet ainsi un contrôle rigoureux de la production d'AMPc dans les cellules.

Il existe d'autres formes de protéines G. La protéine G_{PLC} impliquée dans l'activation de la phospholipase C. La protéine G_K qui active l'ouverture des canaux potassium à la surface des cellules. La protéine G_t qui couple la rhodopsine à la GMPC phosphodiesterase (Palczewski et Benovic, 1991; Barritt, 1994).

2.2.3. L'adénylate cyclase

L'adénylate cyclase a pour fonction de transformer l'ATP en AMPc (*figure 6*). Cette conversion va avoir pour effet d'augmenter la concentration en AMPc cytosolique jusqu'à 4 fois par rapport à sa concentration initiale dans la cellule non stimulée (Barritt, 1992). L'adénylate cyclase est activé par la sous-unité α d'une protéine G activée (Choi *et al.*, 1993).

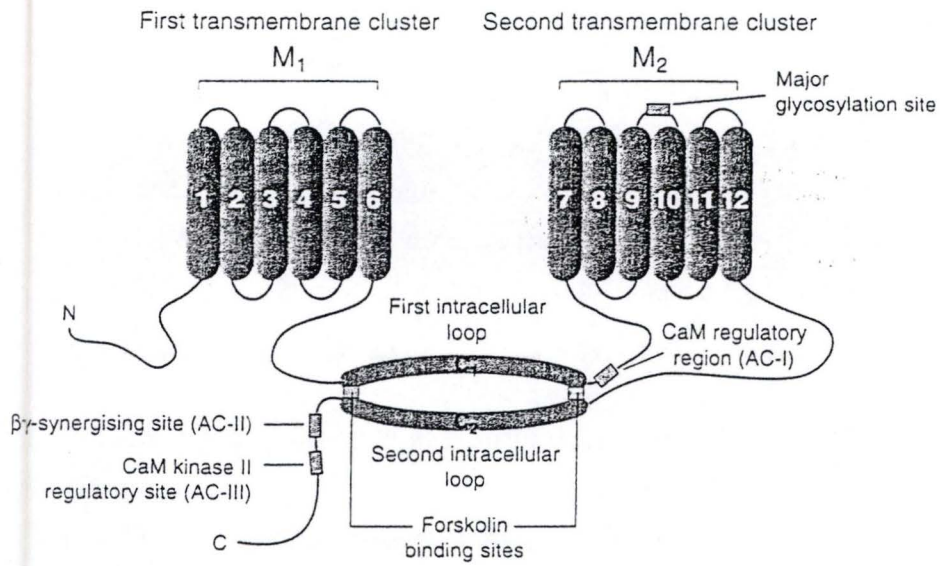


Figure 7 : Structure de l'adénylate cyclase chez les cellules animales

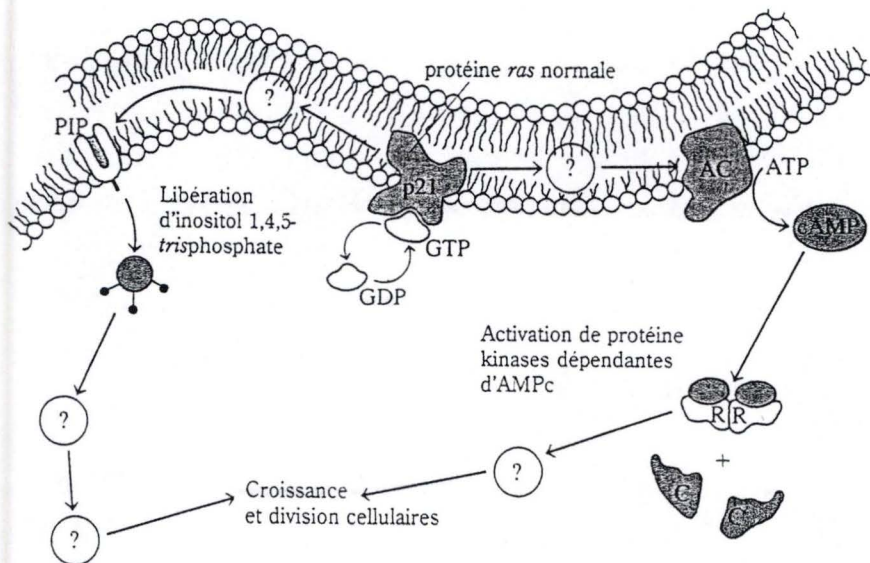


Figure 8 : Implication de la protéine *ras* dans la croissance et la division cellulaire

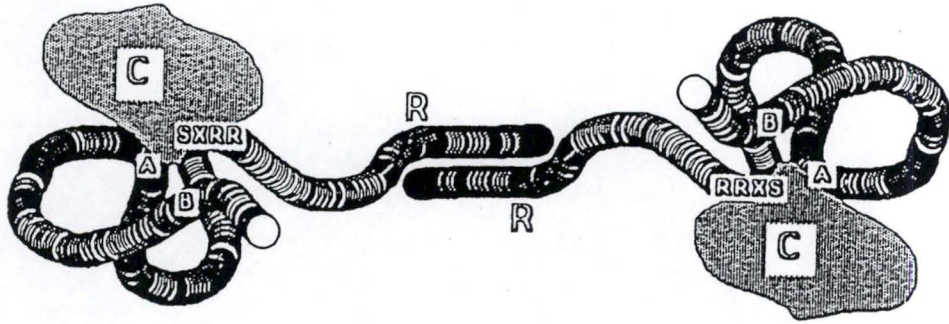


Figure 9 : Structure de la protéine kinase dépendante de la voie de l'AMPc chez les cellules animales

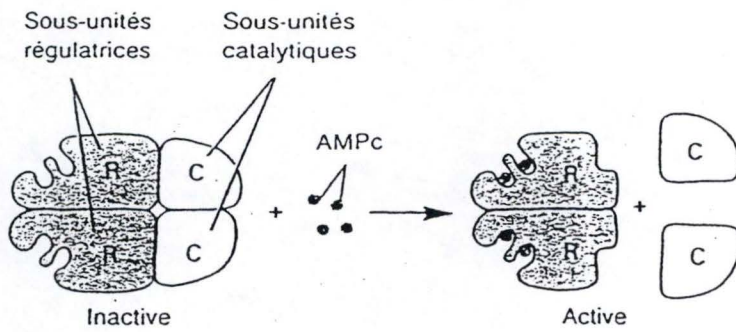


Figure 10 : Activation de la PKA par l'AMPc

L'adénylate cyclase (*figure 7*) est une protéine transmembranaire intrinsèque de 120 kDa dont on a recensé au moins 9 types différents chez les mammifères (Houslay et Milligan, 1997). L'extrémité N-terminale de la protéine est formée de 6 séquences transmembranaires relié à un autre domaine, formé lui aussi de 6 séquences transmembranaires, par une région hydrophile cytoplasmique de 43 kDa. L'extrémité carboxy-terminale de la protéine constitue un domaine hydrophile cytoplasmique de 36 kDa. Ces deux régions hydrophiles (36 et 43 kDa) interagissent pour le site catalytique de l'enzyme. Celui-ci est bordé, de part et d'autre, par un site de liaison pour la forskoline, un activateur naturel de l'adénylate cyclase isolée de la plante indienne *Coleum foeskoli* (Hosley et Milligan, 1997). A l'opposé, des molécules telles que le 2'-O-méthyladénosine et le 2',3'-didéoxyadénosine inhibent l'adénylate cyclase en se fixant au niveau du site catalytique de l'enzyme (De Jonge, 1996). De telles molécules sont couramment utilisées pour étudier la transduction du signal via l'adénylate cyclase.

Certaines adénylates cyclases peuvent être régulées par les complexes calmoduline- Ca^{2+} . Cette régulation par le calcium montre que la voie de l'AMPc n'est pas isolée dans la cellule, mais interagit avec d'autres voies de transduction du signal (Darnell *et al.*, 1988).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité de l'adénylate cyclase peut également être régulée par la protéine *ras*. Il s'agit d'une petite protéine liant le GTP, comme les protéine G, impliquée dans le contrôle de la croissance et de la division cellulaire (*figure 8*) (Rawn, 1990; Wittinghofer et Pai, 1991; Kaziro *et al.*, 1991; Burgering et Bos, 1995).

2.2.4. La protéine kinase A (PKA)

La PKA est un tétramère constitué de deux sous-unités catalytiques et de deux sous-unités régulatrices (*figure 9*). La PKA est activée par l'AMPc produit par l'adénylate cyclase. Deux molécules d'AMPc se fixent sur chacune des sous-unités régulatrices et induisent un changement de conformation qui libère les sous-unités catalytiques (*figure 10*). Ces dernières activent différents effecteurs enzymatiques ou

migrent dans le noyau où elles activent certains facteurs de transcription par phosphorylation (Darnell *et al.*, 1988; Rawn, 1990; Taylor *et al.*, 1993; Barritt, 1994).

Plusieurs types de sous-unités régulatrices (RI α , RI β , RII α et RII β) ainsi que catalytiques (C α et C β) ont été décrites dans la littérature. Ces différentes sous-unités ne se retrouvent pas simultanément dans toutes les cellules et tous les organismes. Par exemple, les sous-unités RI α , RII α et C α se retrouvent essentiellement dans les cellules germinatives mâles, tandis que les sous-unités C β , RI β et RII β se retrouvent principalement dans les cellules du cerveau et sont absentes dans de nombreux autres tissus (McKnight *et al.*, 1988).

On observe généralement une différence entre le taux de sous-unités régulatrices et le taux de sous-unités catalytiques qui permet d'exercer un contrôle de l'activité de la PKA. Un léger excès de sous-unités régulatrices par rapport aux sous-unités catalytiques empêche l'activation des effecteurs enzymatiques et facteurs de transcription en absence d'AMPc. Cette différence de concentration permet également de garder une activité PKA basale faible dans une cellule non stimulée (Stanley McKnight *et al.*, 1988).

Certaines sous-unités possèdent des activités ou fonctions particulières. Dans les cellules fœtales, la sous-unité RI α permet d'entretenir un faible taux de transcription des gènes normalement sous contrôle du facteur CREB en absence d'AMPc. En fait, RI α agirait comme un agoniste de l'AMPc (Lee, 1991).

Une activité topoisomérase a également été décrite pour la sous-unité régulatrice RII (Constantinou *et al.*, 1985). Les topoisomérases sont des enzymes qui modifient le degré de super-enroulement de l'ADN, facilitant la réplication, la transcription et les recombinaisons de l'ADN. Ces enzymes réalisent soit des coupures simple brin (topoisomérase I), soit des coupures double brin (topoisomérase II) (Suzuki *et al.*, 1991). L'activité topoisomérase n'apparaît que lorsque la sous-unité RII est activée par phosphorylation via par une sous-unité catalytique.

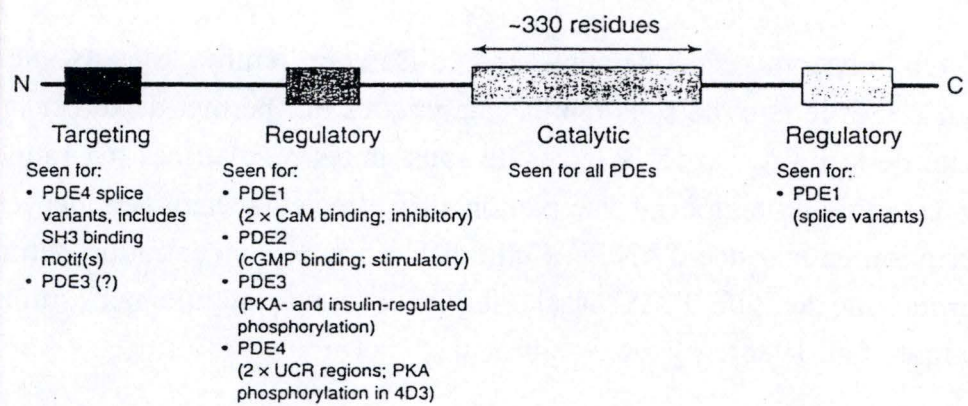


Figure 11 : Structure de la phosphodiesterase

2.2.5. Régulation du taux d'AMPc dans les cellules

Les variations de la concentration en AMPc dans les cellules sont souvent transitoires. La régulation de la concentration en AMPc dans les cellules se trouve sous le contrôle de deux enzymes principales : les phosphodiésterases et les phosphatases.

2.2.5.1. Les phosphodiésterases

Le rôle des phosphodiésterases (*figure 11*) est d'hydrolyser le lien ester en position 3' du 3',5'-cyclic AMP. Comme pour le cas de l'adénylate cyclase, la phosphodiésterase fait partie d'une grande famille multigénique. Certaines phosphodiésterases sont spécifiques de l'AMPc; d'autres, du GMPc; un troisième groupe utilise à la fois l'AMPc et le GMPc comme substrat. En plus de leur nombreuses formes (plus de 8 formes différentes au niveau du foie), les phosphodiésterases se retrouvent dans de nombreux compartiments cellulaires.

Le complexe Ca^{2+} /calmoduline active certaines formes de phosphodiésterases. Dans ce cas, une augmentation du taux de Ca^{2+} dans la cellule induit une dégradation accélérée de l'AMPc (Garritsen *et al.*, 1992). Dans les tissus adipeux et dans le foie, l'insuline active différents types de phosphodiésterases en se liant sur des récepteurs couplés à des protéines G. La PKA régule l'activité des phosphodiésterases par phosphorylation. Cette activation constitue un feed-back négatif sur la dégradation d'AMPc.

L'activité de l'adénylate cyclase est inhibée par des dérivés de l'AMPc et par d'autres molécules cycliques comme la xanthine et ses dérivés (Ohmori *et al.*, 1993). Quelques exemples d'inhibiteurs des phosphodiésterases sont repris dans le tableau ci-dessous (Barritt, 1994).

Famille d'inhibiteurs	Exemples d'inhibiteurs spécifiques
Dérivés de l'AMPc	2-trifluorométhyl AMPc AMPc IMPc 8-bromo AMPc 8-amino AMPc 8-thiométhyl AMPc N ⁶ -butyryl AMPc N ⁶ -benzoyl AMPc
Dérivés du méthylxanthine	1,3,7,-triméthylxanthine 1,3-diméthylxanthine 1-méthyl-3-isobutylxanthine
Papaverine et composés relatifs	papaverine
Dérivés d'oxo-quinoline	6,7-diméthoxy-4-éthylquinazoline
Imidazolidinones	4-(3,4-diméthoxybenzyl)-2-imidazolidone 4-(3-butoxy-4-méthoxybenzyl)-2-imidazoline
Dérivés de pyrrolidone	4-(3-cyclopentyl-4-méthoxyphényl)-2-pyrrolidone
Dérivés de pirazine	5-(4-acétamidophényl)pyrazine-2-[1H]-one
Pyrazolopyridines	1-éthyl-4-(isopropylidène hydrazine)-1H-pyrazolo-(3,4- <i>b</i>)-pyridine-5-carboxylique acid, éthyl ester, HCl
Benzodiazepines	chlordiazépoxyde

2.2.5.2. Les phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes qui déphosphorylent des protéines précédemment phosphorylées sur des résidus sérine, thréonines et tyrosine. Ces enzymes agissent en commun avec des kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines. Les phosphatases appartiennent à trois familles de gènes différents. Deux de celles-ci codent pour des phosphatases qui agissent sur les résidus sérines/thréonines. La troisième famille se compose de protéines qui agissent sur les résidus tyrosines. Deux phosphatases différentes interviennent au niveau de la voie de l'AMPc, la phosphoprotéine phosphatase de type 1 (PP-1) et la phosphoprotéine de type 2A (PP-2). Ces deux phosphatases font partie de la famille des phosphatases agissant sur les résidus sérine ou thréonine (Barritt, 1994).

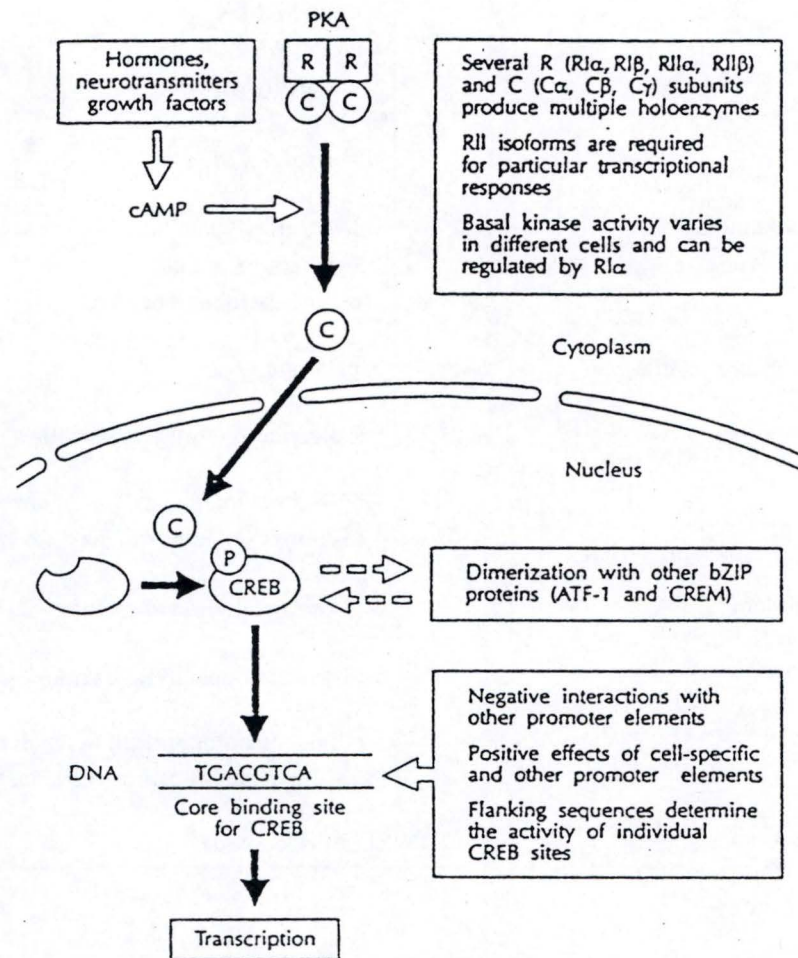


Figure 12 : Activation du facteur CREB par la PKA

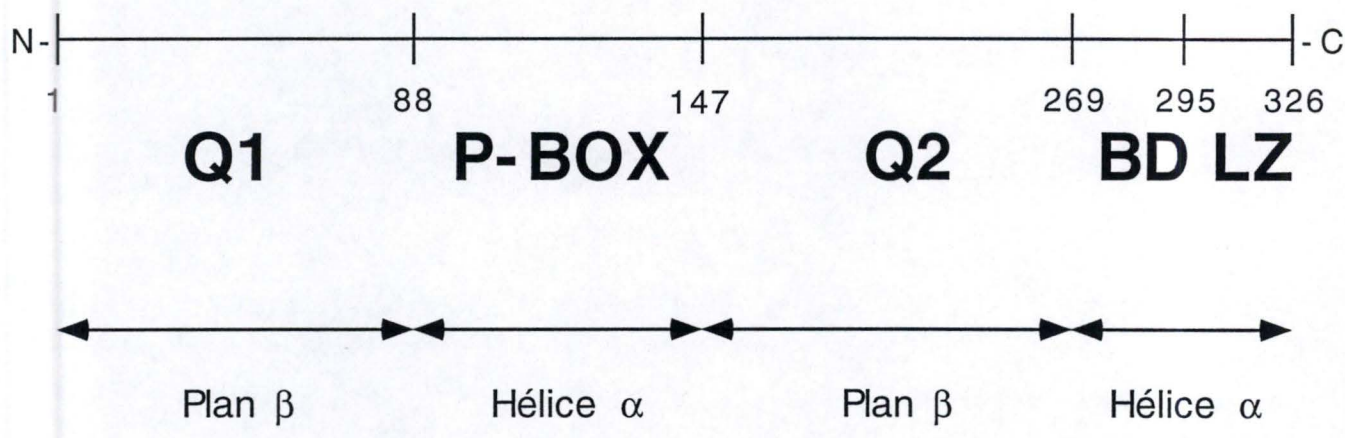


Figure 13 : Structure du facteur de transcription CREB

La PP-1 est un homodimère constitué d'une sous-unité catalytique (d'un poids moléculaire de 37 kDa) et d'une sous-unité régulatrice. Il existe différentes formes de PP-1, variant suivant leur sous-unité régulatrice, qui sont associées avec diverses structures cellulaires dont le noyau par exemple. La sous-unité régulatrice de la PP-1 est un substrat de la PKA activée par l'AMPc. La phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la PP-1 va induire la translocation de la sous-unité catalytique de celle-ci dans le cytoplasme ou le nucléoplasme, où elle pourra exercer son action. L'AMPc régule également l'inhibition de cette PP-1 en activant, par l'intermédiaire de la PKA, un inhibiteur qui, une fois phosphorylé va se fixer sur la PP-1 active pour l'inactiver.

La PP-2A, quant à elle, est formée de 3 sous-unités dont une de celles-ci est la sous-unité catalytique. Il existe deux isoformes de la sous-unité catalytique qui montrent toutes les deux de l'homologie pour PP-1. De plus, les substrats de cette phosphatase sont les mêmes que pour la PP-1.

2.2.6. Le facteur de transcription CREB

La dernière étape de la voie de transduction du signal médiée par l'AMPc est l'activation du facteur CREB. Une région précise au niveau de l'ADN, les éléments CRE (cAMP response elements), est le lieu d'action des facteurs CREB activés (Montminy et Bilezikjian, 1987). Le facteur CREB est un facteur de transcription de la classe des protéines b-ZIP (ou leucine zipper), activé par la PKA via une phosphorylation qui conditionne sa fixation sur l'ADN (*figure 12*).

2.2.6.1. Structure du facteur de transcription CREB

Le facteur de transcription CREB (*figure 13*) est composé de 4 domaines distincts : un domaine amino-terminal riche en glutamine, un domaine phospho-accepteur (domaine P-box), un domaine de liaison au grand sillon de l'ADN riche en acides aminés basiques et, enfin, un domaine carboxy-terminal "leucine zipper" permettant la dimérisation (Lee, 1991).

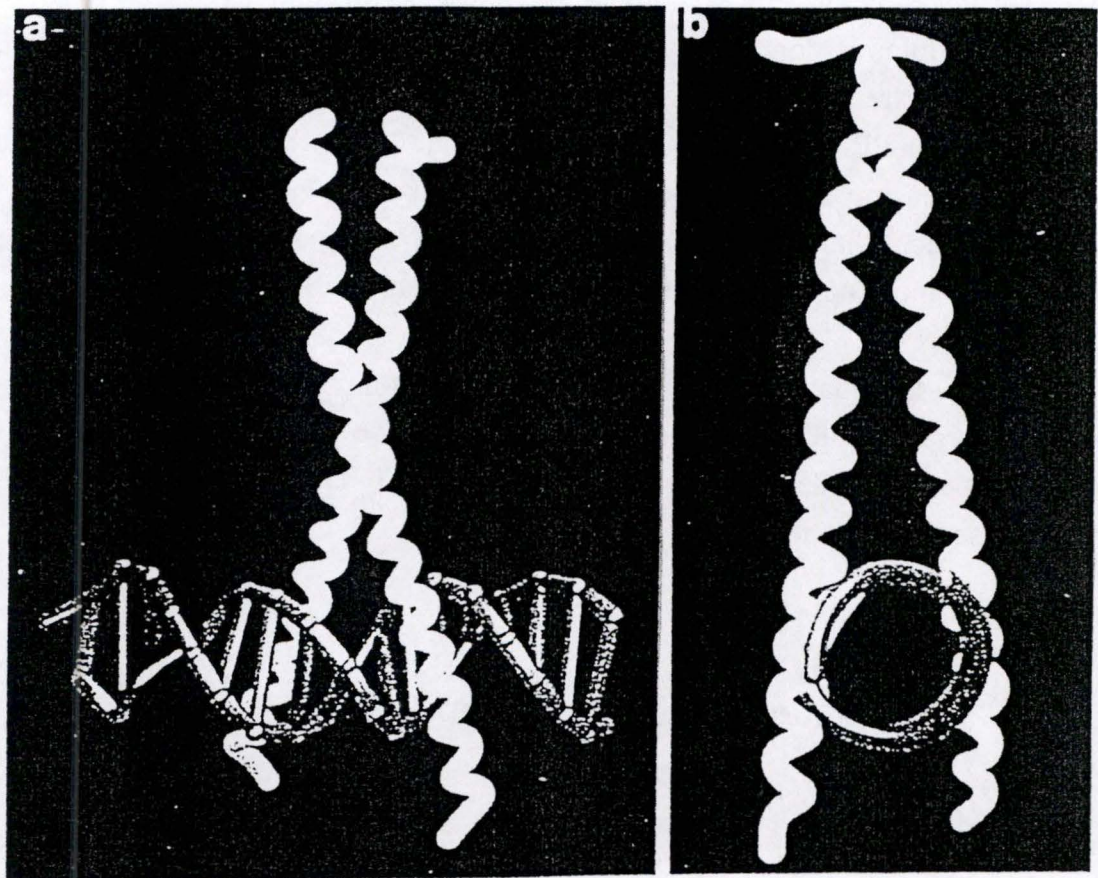


Figure 14 : Fixation d'une protéine leucine Zipper au niveau de l'ADN

- A. Fixation de la protéine au niveau du grand sillon de l'ADN
- B. Interaction entre les acides aminés des domaines basiques, chargés positivement, avec les charges négatives des phosphates de l'ADN

Le domaine amino-terminal de CREB est impliqué directement dans le mécanisme d'activation de la transcription. Ce domaine comprend deux domaines trans-activateurs riches en glutamine, Q1 et Q2, formant des feuillets β capables d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle (Lee, 1991; Lalli et Sassone-Corsi, 1994).

Le domaine "P-box" est composé d'une région de plus ou moins 50 acides aminés (le "kinase-inducible domain" ou KID) qui contient la sérine-133 phospho-acceptrice. La phosphorylation de la sérine-133 produit un changement de conformation de la protéine qui expose les domaines Q1 et Q2 du domaine transactivateur activant ainsi la transcription (Lee, 1991; Lalli et Sassone-Corsi, 1994). CREB comporte également deux autres régions contenant des sites phosphoaccepteurs pour la protéine kinase C (PKC), la glycogène synthase kinase III, et la caseine kinase II et I (Gonzalez *et al.*, 1989).

Le domaine basique nécessaire à la fixation sur l'ADN est un domaine chargé positivement composé d'acides aminés basiques placés tous les trois ou quatre acides aminés. Les charges positives entrent en interaction avec les charges négatives des phosphates de l'ADN. Cette région basique forme une hélice α qui permet au facteur CREB de se lier au niveau du grand sillon de l'ADN (*figure 14*).

Le domaine carboxy-terminal permet la dimérisation du facteur CREB. Il est constitué d'un motif "leucine zipper". Ce motif comprend 4 acides aminés leucine. Chaque acide aminé leucine est séparé d'un autre par 6 acides aminés (Hoeffler *et al.*, 1988; Lalli et Sassone-Corsi, 1994). Le facteur CREB, sous forme de dimère, se lie à l'ADN sur des régions palindromiques, chaque monomère contenant la moitié du palindrome (Berkowitz et Gilman, 1990; Lamb et McKnight, 1991). Le facteur de transcription CREB se fixe sur les séquences conservées CRE (5'- TGACGTCA-3') répétées dans le promoteur de nombreux gènes dont la transcription dépend de l'AMPc (Montminy *et al.*, 1986; Montminy et Bilezikjian, 1987). Le domaine leucine zipper d'un facteur CREB forme une hélice α amphipatique qui s'associe avec la même hélice α d'un autre facteur CREB pour former une super-hélice (appelée "coiled-coil"). Le rapprochement des deux hélices est permis grâce au caractère hydrophobe des chaînes latérales des acides aminés constitutifs des deux hélices. Cette interaction est également stabilisée par des ponts hydrogènes entre des résidus proches des leucines.

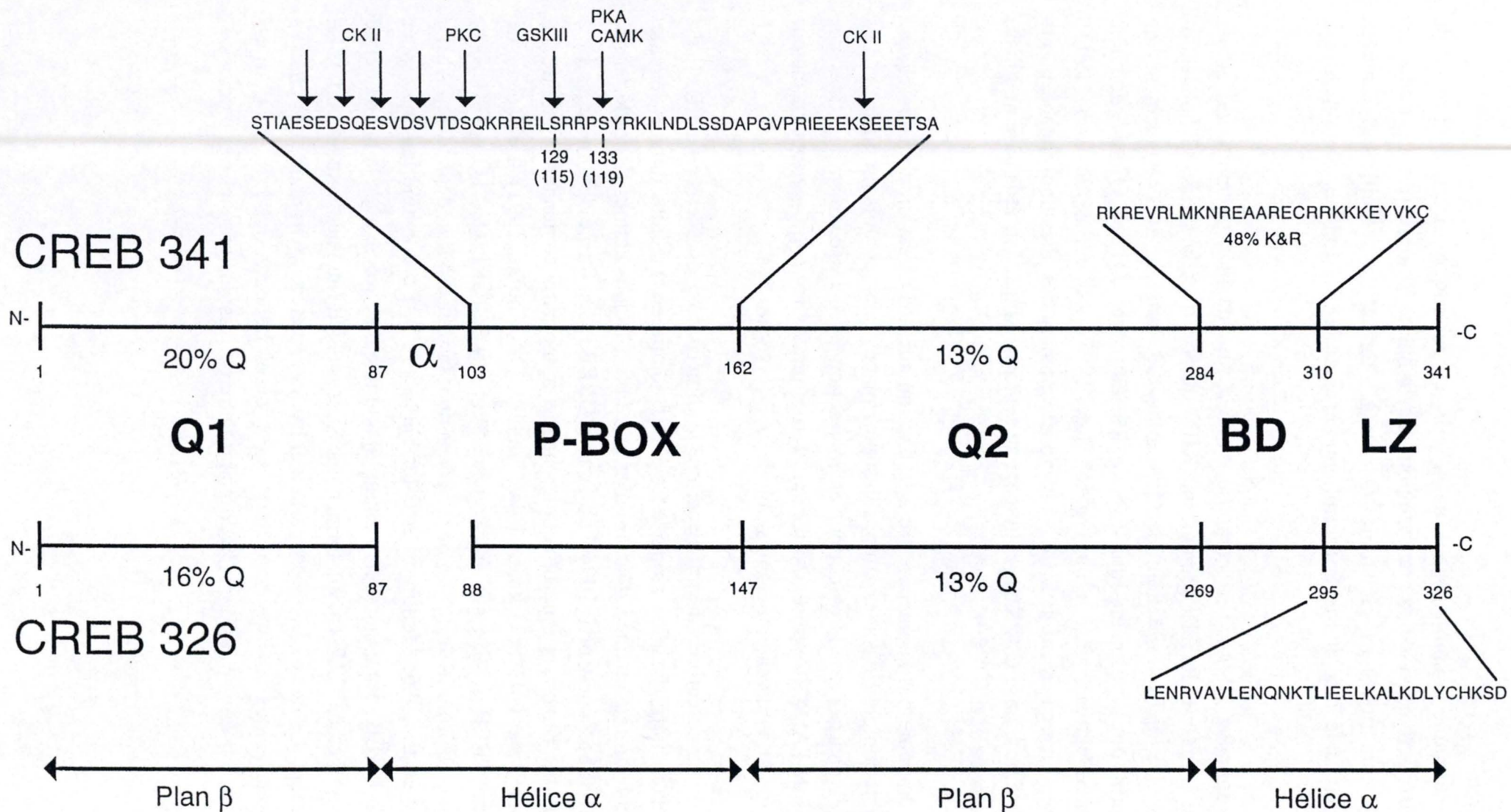


Figure 15 : Structures des deux isoformes du facteur de transcription CREB

2.2.6.2. Régulation du facteur de transcription CREB

Un facteur CREB ne dimérise pas toujours avec un autre facteur CREB; il peut également former des dimères avec d'autres facteurs de transcription de la famille des leucine zipper. Cette hétérodimérisation permet de réguler l'activité du facteur CREB. Les protéines leucine zipper ATF-1 et CREM peuvent former des hétérodimères avec CREB et sont soupçonnées être des inhibiteurs naturels de la fonction CREB dans la cellule. Ces deux protéines ressemblent à CREB mais ne possèdent pas de domaines transactivateurs et forment donc des hétérodimères inactifs avec CREB. L'existence de plusieurs isoformes d'ATF-1 et CREM augmente le champ de régulation de CREB dans la cellule (Hai et Curran, 1991).

Un deuxième type de régulation du facteur CREB est la déphosphorylation de celui-ci. La phosphorylation du facteur CREB est indispensable pour l'activation de la transcription (Gonzalez et Montminy, 1989) et sa déphosphorylation a pour effet l'inactivation du facteur CREB et donc la fin de la transcription. Ainsi, la mutation de la sérine-133 empêchant la phosphorylation, ne permet pas l'activation du facteur CREB (Berkowitz et Gilman, 1990). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de phosphatases a permis de mettre en évidence la participation de phosphatases PP-1 et PP-2A dans l'atténuation de la transcription médiée par les facteurs de transcription CREB phosphorylés (Hagiwara *et al.*, 1992; Wadzinski *et al.*, 1993).

Enfin, l'épissage alternatif représente le troisième type de régulation connu pour le facteur CREB. Deux formes distinctes du facteur CREB (*figure 15*) sont exprimées dans les cellules mammaliennes (Berkowitz et Gilman, 1990). Ces deux formes sont CREB-A (326 acides aminés) et CREB-B (341 acides aminés) qui ne se distinguent que par une séquence de 14 acides aminés se trouvant au niveau du facteur CREB-B entre les positions 88 et 102. C'est l'épissage alternatif d'un même transcrit primaire qui serait à l'origine des deux formes CREB-A et CREB-B. Les deux formes du facteur CREB décrites l'une dans les cellules de cerveau de rat (Gonzalez *et al.*, 1989) et l'autre au niveau du placenta humain (Hoeffler *et al.*, 1988) seraient également le fruit d'un épissage alternatif et non d'une différence entre espèces.

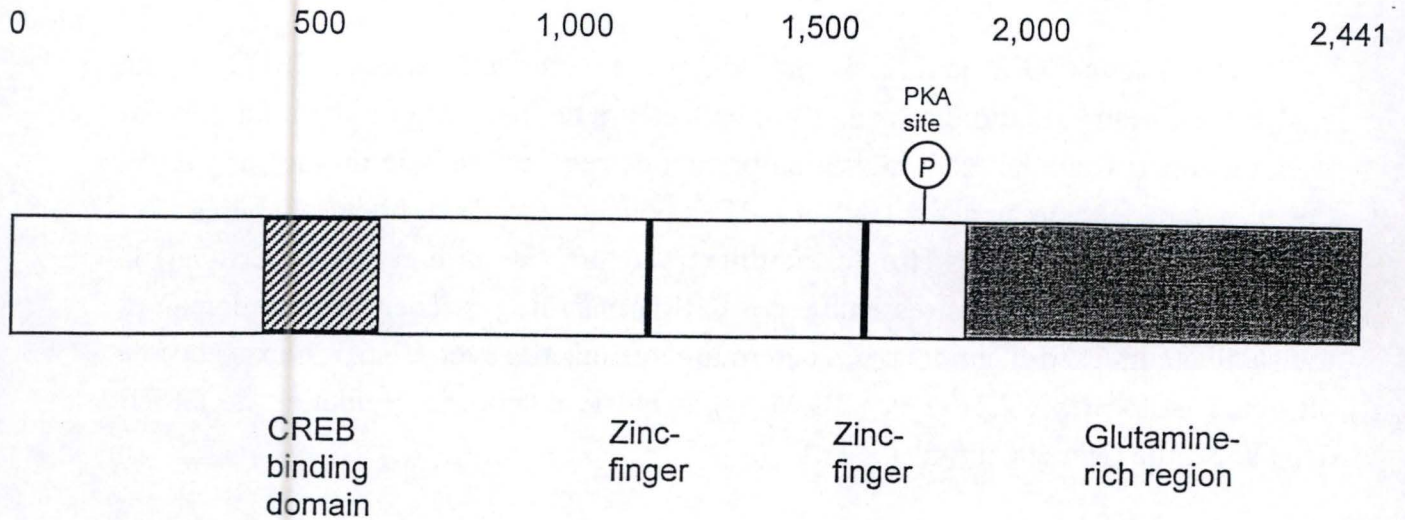


Figure 16 : Structure de la protéine CBP

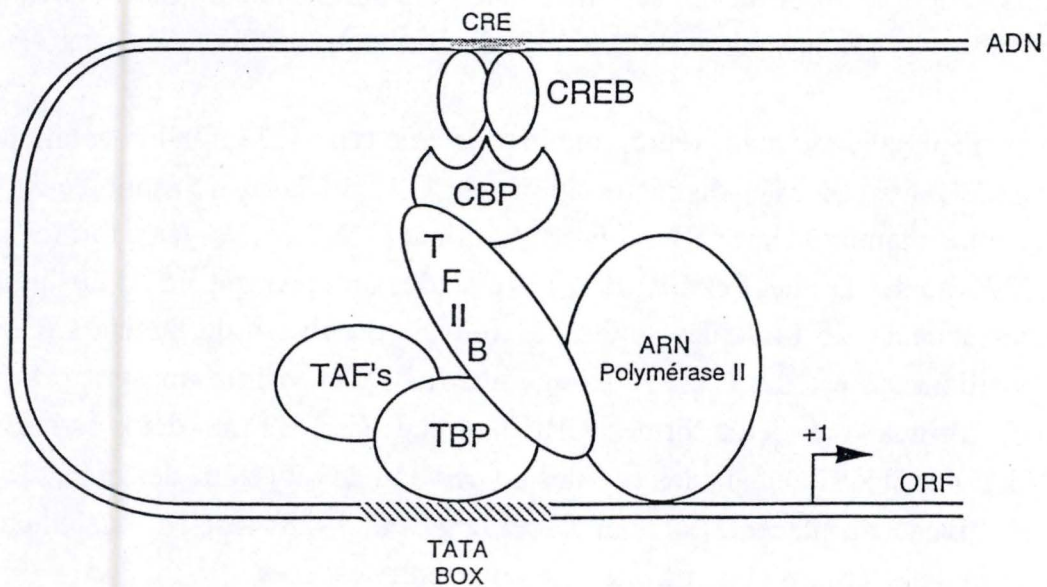


Figure 17 : Interaction du facteur de transcription CREB et de la protéine CBP avec la machinerie de transcription

2.2.6.3. Protéines interagissant avec CREB lors de l'activation de la transcription

L'activation de la transcription par CREB nécessite l'intervention de plusieurs protéines adaptatrices permettant de relier CREB à la machinerie transcriptionnelle.

La CREB-binding protein (CBP) est un exemple de protéine adaptatrice faisant le lien entre la machinerie basale de transcription et CREB (Chrivia *et al.*, 1993; Nordheim, 1994). CBP est une protéine de masse moléculaire comprise entre 250 et 265 kDa possédant un bromodomaine important pour les interactions protéine-protéine, un domaine homologue aux doigts de zinc et un domaine riche en glutamine. Elle possède plusieurs sites de phosphorylation pour la calmoduline kinase II et un site de phosphorylation pour la PKA (*figure 16*) (Chrivia *et al.*, 1993).

Le domaine activateur de CBP interagit avec la machinerie basale de transcription au niveau du facteur TFIIB (*figure 17*). Ce facteur interagit, quant à lui, avec le facteur TBP (TATA-box-binding-protein). Ces interactions facilitent le recrutement de l'holoenzyme DNA polymérase II en collaboration avec les protéines TAFs (TBP-associated factor). L'intervention de la protéine CBP permet de faire interagir un élément CRE, situé assez loin du site d'initiation de la transcription, avec la machinerie transcriptionnelle contrôlant l'expression de gènes dépendants de l'AMPc. Le domaine Q2 de CREB, exposé après phosphorylation, recrute également le facteur TFIID en interagissant avec dTAF_{II}110 (Ferreri *et al.*, 1994).

3. La voie de l'AMPc chez les végétaux

3.1. L'AMPc chez les végétaux

L'étude de la voie de l'AMPc chez les végétaux a été et est toujours soumise à de nombreuses controverses.

La première controverse portait sur l'existence même de l'AMPc chez les plantes. Il est clair cependant que l'AMPc existe bien chez les plantes. Des mesures par HPLC, spectrométrie de masse et par essais biologiques ont en effet confirmé l'existence d'AMPc chez les plantes (Bolwell, 1995).

La deuxième controverse portait, quant à elle, sur la concentration de l'AMPc dans les cellules végétales. Les premières estimations de la quantité d'AMPc chez les végétaux faisaient état de concentrations allant du nM au μ M dans des tissus frais (Assmann, 1995). Cette variabilité dans les mesures résultait de la difficulté de faire la distinction entre le 2':3'-cAMP et le 3':5'-cAMP entraînant une surestimation de la concentration réelle en AMPc dans les cellules. A cela s'ajoutent les interférences dues au métabolisme secondaire : quantité importante de phosphodiesterase et de phosphatases. Actuellement, on se rend compte que la concentration en AMPc dans les cellules végétales est nettement inférieure à celle trouvée dans les cellules animales (jusqu'au μ M) (Rawn, 1990). Des travaux plus récents et utilisant la radio-immunologie ont montré des concentrations de 36 nM (Ishioka *et al.* en 1990) et de 70 nM (Gangwani *et al.* en 1991). Cette différence entre cellules animales et végétales est, peut-être, encore faussée par le fait que les mesures sont réalisées sur des homogénats cellulaires ne tenant pas compte de la présence de vacuoles (qui occupent 90 % du volume cellulaire), des différences entre des tissus différents et de la présence de concentrations importantes de phosphodiesterases et de phosphatases dans de nombreux compartiments subcellulaires.

3.2. Les intermédiaires de la voie de l'AMPc chez les végétaux

3.2.1. Les protéines G

Tout semble indiquer que les plantes possèdent également des protéines G. Un gène codant pour une protéine ayant de l'homologie pour une sous-unité α de protéine G a été isolée chez *Arabidopsis thaliana* (Ma *et al.*, 1990; Kaziro *et al.*, 1991). Ce gène a été cloné par PCR d'après des séquences codant pour une sous-unité α de mammifères et de levures. Cette protéine GP α 1 présente des similarités importantes avec toutes les sous-unité α connues chez les animaux (36 % des acides aminés sont

identiques et 73 % sont similaires). Actuellement, plusieurs gènes codant pour d'autres sous-unités α et β ont été clonés chez les végétaux supérieurs.

Des anticorps dirigés contre des protéines G animales reconnaissent également des protéines G végétales. Dans le cadre de l'étude de l'activation de protéines G par la lumière bleue dans des pois étiolés, Warpeha et al (1991) ont montré qu'un polysérum dirigé contre 2 sous-unités α différentes reconnaissait une protéine de 40 kDa dans une préparation membranaire de pois.

Des arguments pharmacologiques attestent également de la présence de protéines G chez les plantes. L'utilisation de GTP γ S, un activateur de protéines G et de GDP β S, un inhibiteur de protéine G, a permis de montrer que le fonctionnement des protéines G chez les plantes était similaire à celui des cellules animales. Par exemple, le GTP γ S stimule l'activité phospholipase D au niveau végétal (Causier et Millner, 1996). Ces résultats ont également été confirmés par l'utilisation de la toxine cholérique et pertussique (Armstrong et White, 1992).

3.2.2. L'adénylate cyclase

Très récemment, le premier gène codant pour une adénylate cyclase (accession number T15055) a été cloné chez les végétaux. L'activité adénylate cyclase a été mise en évidence différentes plantes. Par exemple, une adénylate cyclase active au niveau des tiges a été décrite chez *Pisum sativum* (Pacini *et al.*, 1993). Il s'agit de la première adénylate cyclase produisant le 3',5'-cAMP trouvée chez les végétaux. Une autre activité adénylate cyclase a été observée chez *Medicago sativa* (Carricarte *et al.*, 1988).

Une activité adénylate cyclase a également été détectée dans les tubes polliniques en croissance. L'utilisation simultanée de forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) et d'IBMX⁶ (un inhibiteur de phosphodiesterase) permet de provoquer la croissance des tubes polliniques (Tezuka *et al.*, 1993).

3.2.3. La PKA

La première kinase de plante découverte possédait une homologie importante avec la PKA animale. Cette homologie fut cependant "oubliée" suite à la difficulté de mise en évidence de l'AMPC chez les végétaux. Actuellement, aucune véritable PKA n'a été trouvée dans les tissus végétaux (Budde et Randall, 1990; Li *et al.*, 1994; Bolwell, 1995).

3.2.4. Le facteur CREB

La présence d'AMPC et sa participation dans une voie de transduction du signal impliquerait également la présence du facteur de transcription CREB. Des indices de l'existence de ce facteur ont été trouvés depuis un certain temps. Le clonage et le séquençage de cDNA codant pour des protéines b-ZIP végétales et la comparaison de leur séquence a permis de créer la famille des protéines b-ZIP végétales. Certaines de ces protéines sont transactivatrices aussi bien *in-vivo* que *in-vitro*. Les cibles de ces protéines sur l'ADN sont des séquences TGACGTCA qui se retrouvent avec quelques différences au niveau des séquences CRE chez les animaux (Armstrong *et al.*, 1992; Ishiguro *et al.*, 1993). Dans les expériences menées par Armstrong (1992), l'analyse des composants de la voie de transduction du signal a permis de caractériser des protéines agissant au niveau du promoteur de la chalcone synthase en se fixant sur une région régulatrice contenant la séquence ACGT. Le clonage de cDNA codant pour trois facteurs végétaux interagissant sur l'ADN a permis de déterminer qu'ils contenaient un domaine b-ZIP. Ces facteurs sont appelés CPRFs (common plant regulatory factor). Dans cette expérience, les trois CPRFs agissent soit sous forme d'homodimères, soit sous forme d'hétérodimères. Comme le facteur CREB chez les animaux, les CPRFs sont des protéines de la famille des leucines zipper et reconnaissent des séquences conservées au niveau du promoteur de certains gènes.

Malgré l'existence de protéines CREB-like chez les végétaux, il n'existe pas encore de démonstration expérimentale d'un lien direct entre la production d'AMPC et l'activation des protéines CREB-like.

3.3. Fonction signalétique de l'AMPC chez les végétaux

Après avoir montré que tous les intermédiaires de la voie de transduction du signal médiée par l'AMPC étaient présents chez la plante, il restait à démontrer que l'AMPC y avait (ou non) une fonction signalétique.

L'addition d'AMPC aux cellules végétales semble induire différentes réponses physiologiques. En effet, l'AMPC joue, par exemple, un rôle dans l'élongation des tubes polliniques après auto-pollinisation incompatible chez *Tradescantia paludosa* et chez *Arachis hypogea*, et dans l'induction du sexe chez *Bryum argenteum* (Tezuka *et al.*, 1993).

Un exemple d'expérience montrant l'action de l'AMPC au niveau végétal est celle réalisée avec les cellules mésophylles de *Vicia faba L.* (Li *et al.*, 1994). Dans cette expérience, il a été prouvé que l'AMPC activait l'ouverture des canaux potassium au niveau de ces cellules du mésophylle. Pour mettre en évidence le rôle de l'AMPC, des homologues de l'AMPC ont été utilisés dont le 8-bromo-cAMP, le dibutyryl-cAMP, l'AMP, le cGMP, le GMP. En plus de ces molécules, des inhibiteurs de PKA ont été utilisés pour déterminer si l'ouverture de canaux potassiques était sous la dépendance d'une kinase AMPC-dépendante. Les résultats de ces expériences montrent que l'AMPC peut avoir une action au niveau végétal et que cette action se réalise en partie grâce à une protéine PKA-like.

Une dernière expérience est celle impliquant l'AMPC dans l'élongation des tubes polliniques après auto-pollinisation incompatible chez *Lilium longiflorum* (Tezuka *et al.*, 1993). L'expérience fait intervenir ici deux autres molécules activant la voie de l'AMPC, le 3-isobutyl-1-méthylxanthine qui inhibe l'activité de la phosphodiesterase et la forskoline qui active l'adénylate cyclase.

II. Buts du mémoire

Buts du mémoire

Bien que tous les intermédiaires de la voie de transduction du signal médiée par l'AMPC aient été identifiés chez les végétaux supérieurs, il n'existe à l'heure actuelle, aucune preuve claire du rôle de cette voie signalétique. Dans ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un intermédiaire bien précis de cette cascade, à savoir le facteur de transcription CREB dont le rôle est d'activer la transcription de certains gènes en présence d'AMPC.

Le but de ce mémoire est l'obtention de sondes immunologiques dirigées contre le domaine de liaison à l'ADN et/ou le domaine de dimérisation du facteur de transcription CREB de la chicorée industrielle (*Cichorium intybus*).

Afin d'atteindre ce but, les fragments CREB480 et CREB540 codant pour les protéines p480 et p540 seront clonés dans un vecteur d'expression, le plasmide pET-15b. Ce plasmide permettra la surexpression des inserts, dans des souches particulières d'*E.coli*, et donc la production en quantité suffisante des protéines d'intérêt. Celles-ci seront partiellement purifiées à partir d'extraits protéiques et utilisées pour l'immunisation des lapins.

Ces anticorps seront utilisés dans le futur pour étudier les profils de phosphorylation des facteurs CREB lors de diverses situations de stress.

III. Matériel et méthodes

1. Méthodes relatives au clonage des inserts

1.1. Culture d'*Escherichia coli*

- Milieu liquide : milieu LB (Broth Base), 20 g/l
- Milieu solide (LBA) : milieu LB, 20 g/l + agar 1.5 %

La sélection de bactéries recombinantes est réalisée sur milieu LB contenant de l'ampicilline. Celle-ci est utilisée à une concentration de 200 µg/ml. Les antibiotiques sont rajoutés, à partir d'une solution stock à 20 mg/ml, dans le milieu ou sur la boîte de Pétri en fonction des besoins.

Les clones bactériens ont été conservés à -70°C dans du milieu LB liquide contenant 15 % de glycérol (aliquote de 1 ml). Les clones couramment utilisés ont été conservés à 4°C sur milieu LB solide.

1.2. Préparation de l'ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

1.2.1. Mini-préparation d'ADN

Solutions

- Tampon Tris 25 mM (pH 8.0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysozyme 2 mg/ml
- NaOH 0.2 M + SDS 1%
- Acétate de potassium 3 M + acide acétique 1.8 M
- Phénol / chloroforme (24:1)
- Ethanol 96 % (maintenu à -20°C)
- Ethanol 76 % (maintenu à -20°C)
- Tris 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM
- RNase (solution stock à 10 mg/ml)

Protocole

- Ensemencer 10 ml de milieu LB, auxquels est ajouté l'antibiotique adéquat, avec une colonie bactérienne. Incuber la culture pendant une nuit à 37°C sous agitation
- Transvaser 1.5 ml de la solution bactérienne dans un tube Eppendorf de 1.5 ml. Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes et éliminer le surnageant en retournant le tube. Recommencer cette opération deux fois de plus
- Resuspendre le culot dans 150 µl de tampon Tris 25 mM (pH 8.0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysozyme 2 mg/ml (préparé juste avant l'utilisation et stocké dans la glace). Incuber la solution pendant 5 minutes dans la glace
- Rajouter 300 µl de NaOH 0.2 M + SDS 1%. Mélanger la solution au vortex et incubé 5 minutes dans la glace
- Rajouter 150 µl d'acétate de potassium 3 M + acide acétique 1.8 M. Mélanger la solution au vortex et incubé 5 minutes dans la glace
- Centrifuger la solution à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Récolter le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf
- Ajouter au surnageant 400 µl de phénol / chloroforme (24:1). Mélanger la solution au vortex puis centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes
- Récolter la phase aqueuse (supérieure) dans un nouveau tube Eppendorf. Ajouter 1 ml d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C) et incubé à -70°C pendant 10 minutes
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Éliminer le surnageant en retournant le tube
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 76 % (maintenu à -20°C). Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Éliminer le surnageant en retournant le tube
- Sécher le culot au speed-vac pendant 10 minutes
- Resuspendre le culot dans 20 µl de tampon Tris 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM
- Ajouter 1 µl de RNase (solution stock à 10 mg/ml). Incuber pendant 1 heure à 37°C

1.2.2. Midi-préparation d'ADN plasmidique

Solutions

- Tampon Tris 25 mM (pH 8.0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysozyme 2 mg/ml
- NaOH 0.2 M + SDS 1%
- Acétate de potassium 3 M + acide acétique 1.8 M

- Phénol / chloroforme (24:1)
- Ethanol 96 % (maintenu à -20°C)
- Ethanol 76 % (maintenu à -20°C)
- Tris 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM
- RNase (solution stock à 10 mg/ml)
- LiCl 5 M, Tris 50 mM (pH 8.0)
- Acétate de sodium 3 M pH 5.2

Protocole

- Ensemencer 50 ml de milieu LB, auquel est ajouté l'antibiotique adéquat, avec une colonie bactérienne. Incuber la culture pendant une nuit à 37°C sous agitation
- Transvaser la solution bactérienne dans un Falcon de 50 ml et centrifuger à 3000 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364)
- Resuspendre ensuite le culot dans 2.5 ml de tampon Tris 25 mM (pH 8.0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysozyme 2 mg/ml (préparé juste avant l'utilisation et stocké dans la glace). La solution est incubée 10 minutes dans la glace
- Rajouter 5 ml de NaOH 0.2 M + SDS 1%. Mélanger la solution au vortex et incuber 10 minutes dans la glace
- Rajouter 3.75 ml d'acétate de potassium 3 M + acide acétique 1.8 M. Mélanger la solution au vortex et incuber 10 minutes dans la glace
- Centrifuger la solution à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C . Filtrer la solution sur Mira cloth et récolter le surnageant dans un nouveau Falcon de 50 ml
- Ajouter 10 ml d'isopropanol. Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364)
- Resuspendre le culot dans 1 ml d' H_2O
- Ajouter 1 volume de LiCl 5 M, Tris 50 mM (pH 8.0). Mélanger énergiquement et incuber 15 minutes dans la glace
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364)
- Récolter le surnageant et y ajouter 1 volume d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C). Incuber 10 minutes à -70°C
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364)
- Resuspendre le culot dans 0.5 ml de tampon Tris-EDTA (pH 8.0)
- Ajouter 1 μl de RNase (solution stock à 10 mg/ml). Incuber pendant 1 heure à 37°C

- Ajouter au surnageant 1 volume de phénol / chloroforme (24:1). Mélanger la solution au vortex puis centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes. Recommencer cette opération deux autres fois
- Ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 5.2 et 2.5 volumes d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C). Laisser précipiter 10 minutes à -70°C
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C (minifuge)
- Eliminer le surnageant. Laver le culot en ajoutant 0.5 ml d'éthanol à 76 % (maintenu à -20°C)
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (minifuge). Eliminer le surnageant
- Sécher le culot au speed-vac pendant 10 minutes
- Resuspendre le culot dans 50 μl de tampon Tris-EDTA (pH 8.0)

1.3. Dosage d'ADN au spectrophotomètre UV/visible

L'ADN isolé par mini-prep, extrait d'un gel ou purifié après amplification a été dosé au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 260 nm.

- Régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 260 nm
- Régler le zéro de l'appareil en utilisant comme "blanc" le tampon dans lequel se trouve l'ADN
- Diluer 1 μl d'ADN à doser dans 1 ml du tampon dans lequel se trouve l'ADN. Mélanger en retournant la cuvette
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 260 nm au moyen d'une cuvette en quartz
- Convertir la valeur d'absorbance en concentration d'ADN en sachant qu'une densité optique de 1.0 correspond à une concentration d'ADN de 50 $\mu\text{g/ml}$

1.4. Réaction de PCR

La réaction de PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN au moyen d'amorces spécifiques. Au cours de ce mémoire, les réactions PCR ont été réalisées à partir d'ADN en solution et de colonies bactériennes.

Réaction type d'amplification à partir d'ADN en solution

x µl d'ADN (x varie en fonction de la concentration en ADN)
1 µl d'amorce gauche (100 pmoles)
1 µl d'amorce droite (100 pmoles)
5 µl de dNTP (stock à 2 mM)
1 unité enzymatique de Taq polymérase (Boehringer Mannheim)
5 µl de tampon PCR (avec magnésium) concentré 10X
y µl d'H₂O pour atteindre 50 µl

Réaction type d'amplification sur colonies

Colonie bactérienne prélevée à partir d'une boîte de Pétri à l'aide d'un embout stérile
1 µl d'amorce gauche (100 pmoles)
1 µl d'amorce droite (100 pmoles)
5 µl de dNTP (stock à 2 mM)
1 unité enzymatique de Taq polymérase (Boehringer Mannheim)
5 µl de tampon PCR (avec magnésium) concentré 10X
y µl d'H₂O pour atteindre 50 µl

Cycles d'amplification typiques

Un cycle d'amplification type comprend une étape de dénaturation d'une minute à 94°C, une étape d'hybridation d'une minute à x°C (en fonction des amorces utilisées) et une étape d'élongation de 3 minutes à 68°C. Après ces 25 cycles, une élongation supplémentaire de 10 minutes à 68°C est réalisée. Les appareils PCR utilisés lors de ce mémoire sont le PTC-100TM programmable thermal controller (MJ Research) et le Minicycler (MJ Research).

1.5. Purification de l'ADN amplifié (QIAquick Nucleotid Removal Kit, QIAGEN)

Ce kit permet de séparer l'ADN des nucléotides non incorporés, des enzymes ou des amorces.

Protocole

- Mélanger 1 volume de l'échantillon d'ADN et 10 volumes de tampon PN
- Placer une colonne QIAquick dans un tube collecteur de 2 ml
- Placer l'échantillon dans la colonne QIAquick et centrifuger 1 minute à 6000 rpm. Cette étape permet la fixation du ADN sur la résine de la colonne
- Eliminer le liquide se trouvant dans le tube collecteur. Replacer ensuite la colonne QIAquick dans le même tube collecteur
- Ajouter 750 µl de tampon PE et centrifuger à 6000 rpm pendant 1 minute. Cette étape permet de laver l'ADN
- Eliminer le liquide se trouvant dans le tube collecteur et replacer la colonne QIAquick dans le même tube. Centrifuger l'ensemble à 13000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne QIAquick dans un tube Eppendorf de 1.5 ml
- Placer 30 µl de H₂O (pH 8.0) au centre de la colonne. Après 1 minute d'incubation, centrifuger la colonne à 13000 rpm pendant 1 minute. Cette étape permet de décrocher l'ADN de la colonne. On peut recommencer cette dernière opération une seconde fois pour augmenter le rendement de la purification

Rem. : La composition des tampon PN et PE n'est pas fournie dans le kit

1.6. Electrophorèse d'ADN (gel horizontal)

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. La migration des fragments d'ADN dans le gel d'agarose est inversement proportionnelle à leur taille.

L'ADN est détecté dans le gel en présence de bromure d'éthidium. Ce dernier s'intercale entre les 2 brins de l'ADN et peut être visualisé en utilisant un transilluminateur UV.

La taille des fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer un étalon de fragments d'ADN de taille connue. Les étalons utilisés durant ce mémoire sont l'ADN du phage λ restreint par *Hind III* (23 Kb), l'ADN du phage ϕ X174 restreint par *Hae III* (5386 bp) et l'échelle d'ADN de 100 bp (100 bp DNA ladder, Gibco BRL). Le

pourcentage en agarose du gel est ajusté en fonction de la taille des fragments à séparer.

Solutions

- Tampon TAE (Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM pH 8.0)
- Agarose x % (en fonction de la taille des fragments à séparer)
- Bromure d'éthidium (solution stock à 10 mg/ml)
- Bleu de bromophénol (glucose 40 %, bleu de bromophénol 0.025 %)

Protocole

- Préparer un gel d'agarose x % dans le tampon TAE. Ajouter 3 µl de bromure d'éthidium par 50 ml de gel
- Couler le gel dans un support adéquat doté de peignes. Laisser refroidir le gel
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse (Pharmacia)
- Ajouter 1 volume de bleu de bromophénol à 5 volumes d'échantillon à analyser
- Déposer 10 µl de l'échantillon par puits
- Faire migrer les échantillons pendant 1 heure environ à 80 mA dans le tampon d'électrophorèse TAE
- Visualiser les bandes au transilluminateur réglé à 302 nm

1.7. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose (kit QIAEX II)

- Couper la bande de gel contenant l'ADN à purifier à l'aide d'un scalpel tranchant et stérile
- Peser le morceau de gel découpé. Ajouter 3 volumes de tampon QX1 à 1 volume de gel
- Resuspendre la résine QIAEX II au vortex pendant 30 secondes.
- Ajouter 30 µl de QIAEX II à l'échantillon et mélanger (la quantité de QIAEX II ajoutée dépend du nombre de µg d'ADN dans l'échantillon)
- Incuber l'échantillon à 50°C pendant 10 minutes. Maintenir la résine QIAEX II en suspension en vortexant toutes les 2 minutes. Cette étape permet la solubilisation de l'agarose et la fixation de l'ADN à la résine
- Centrifuger la solution à 13000 rpm pendant 30 secondes

- Retirer avec précaution le surnageant avec une pipette
- Ajouter 500 µl de tampon QX1. Resuspendre le culot en vortexant, puis centrifuger à 13000 rpm pendant 30 secondes. Eliminer le surnageant avec une pipette
- Ajouter 500 µl de tampon PE. Resuspendre le culot en vortexant puis centrifuger à 13000 rpm pendant 30 secondes. Eliminer le surnageant avec une pipette. Réaliser cette étape une deuxième fois
- Laisser sécher le culot 30 minutes à l'air
- Ajouter 20 µl de H₂O (pH 8.0) et resuspendre le culot en vortexant. Incuber 5 minutes à température ambiante (cette étape permet l'élution de l'ADN de la résine QIAEX II). Centrifuger à 13000 rpm pendant 30 secondes. Réaliser ce dernier point une seconde fois pour augmenter le rendement de purification

Rem.: Le poids de la bande excisée ne doit pas dépasser 250 mg. La composition des tampons QX1 et PE n'est pas donnée dans le kit.

1.8. Restriction

Les enzymes de restriction coupent l'ADN double brin en des sites particuliers et spécifiquement reconnus. En général, ces sites sont des séquences palindromiques de 4 à 6 acides nucléiques. Une réaction typique est détaillée ci-dessous :

Dans un volume de 20 µl

x µl de ADN à restreindre

2 µl de tampon de restriction (concentré 10x)

1 µl de l'enzyme de restriction (1 unité par µg d'ADN à restreindre)

y µl de H₂O

L'échantillon est alors incubé à 37°C pendant 1 heure pour 1 µg d'ADN. On augmentera le temps d'incubation et la quantité d'enzyme de restriction si la quantité en ADN est supérieure à 1 µg.

Les enzymes de restriction utilisées au cours de ce mémoires sont *EcoR I* (Gibco BRL, 10 U/ μ l), *Hind III* (Gibco BRL, 10 U/ μ l), *BamH I* (Gibco BRL, 10 U/ μ l), et *Xho I* (Gibco BRL, 10 U/ μ l).

1.9. Ligation

La réaction de ligation se réalise avec le pMOSBlue T-vector Kit (*Amersham LIFE SCIENCE*). Une réaction de ligation typique est détaillée ci-dessous :

- 1 μ l de tampon de ligation 10X concentré
- 0.5 μ l de DDT (stock à 100 mM)
- 0.5 μ l d'ATP (stock à 10 mM)
- 1 μ l de vecteur (50 ng)
- y μ l d'insert
- 0.5 μ l de T4 DNA ligase (4 UE/ μ l)
- z μ l H₂O pour arriver à un volume total de 10 μ l

Incuber l'échantillon pendant 2 heures à 16°C dans un bain thermostatisé

Rem: La quantité d'insert à ajouter au vecteur est calculée suivant la formule suivante :

$$[\text{quantité de vecteur (ng) X taille de l'insert (pb) X10}] / \text{taille du vecteur (pb)}$$

1.10. Transformation et sélection

1.10.1. Transformation des bactéries TOP10 (kit One Shot)

Solutions

- Milieu SOC
 - bactotryptone 2 %
 - extraits de levure 0.5 %

- NaCl 10 mM
- KCl 2.5 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM
- Glucose 20 mM

stériliser par autoclavage (20 minutes à 121°C sous 1 atm)

Protocole

- Décongeler les cellules compétentes (50 µl) dans la glace
- Ajouter 2 µl de β-mercaptoethanol et x µl du mélange de ligation. Mélanger au moyen d'une pipette
- Incuber les cellules 30 minutes dans la glace
- Incuber les cellules pendant 30 secondes dans un bain thermostaté à 42°C
- Retirer les cellules du bain le plus rapidement possible et incuber celles-ci dans la glace pendant 2 minutes
- Ajouter 450 µl de milieu SOC (maintenu à 37°C) et incuber les cellules pendant 1 heure à 37°C
- Étaler 125 µl de cellules sur le milieu sélectif adéquat et incuber à 37°C pendant 1 nuit

1.10.2. Préparation de cellules électrocompétentes

- Inoculer 1 litre de milieu LB avec la souche de bactérie. Incuber 1 nuit à 37°C sous agitation
- Centrifuger les cellules à 4000 rpm pendant 10 minutes dans des « biberons » de 250 ml
- Éliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 litre d'eau froide stérile
- Centrifuger les cellules à 4000 rpm pendant 10 minutes dans des « biberons » de 250 ml
- Resuspendre le culot dans 40 ml de glycérol 10 % maintenu à 4°C. Transvaser les bactéries dans un tube Falcon de 50 ml
- Centrifuger à 4000 rpm à 4°C
- Éliminer le surnageant et resuspendre le culot de bactéries dans 4 ml de glycérol 10 % maintenu à 4°C. Aliquoter les cellules (100 µl/Eppendorf)

- Plonger les cellules dans l'azote liquide avant de les stocker à -70°C

1.10.3. Electro-transformation

- Décongeler les cellules électrocompétentes dans la glace
- Dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, préalablement refroidi dans la glace, mélanger 40 μl de cellules électrocompétentes avec 1 μl d'ADN. Incuber l'échantillon pendant 1 minute dans la glace
- Régler l'électroporateur (Gene pulser BIO-RAD équipé d'un Pulse controller et de capacitances additionnelles) à 25 μF et 2.5 kV. Régler le contrôleur de pulses à 200 Ω
- Transférer le mélange bactérien dans une cuvette d'électroporation de 0.2 cm (PulserTM Cuvette 0.2 cm electrode gap, BIO-RAD) préalablement refroidie
- Placer la cuvette entre les deux électrodes de l'électroporateur et envoyer un pulse de 4 à 5 msec
- Ajouter directement 1 ml de milieu SOC (maintenu à 37°C) et incuber pendant 1 heure à 37°C
- Etaler 50 à 100 μl de bactéries sur le milieu sélectif adéquat et incuber à 37°C pendant une nuit à 37°C

1.10.4. Sélection des bactéries recombinantes : test lac Z

Le test lac Z (ou test blanc-bleu) est une méthode de sélection de bactéries transformées basé sur la propriété de complémentation intragénique que possèdent les recombinants issus de la transformation.

La souche bactérienne TOP10, que nous avons utilisée lors de ce mémoire, est déficiente en β -galactosidase. Elle possède cependant un épisome F' dont une partie code pour la région C-terminale inactive α' de la β -galactosidase. La partie N-terminale inactive α de la β -galactosidase est, elle, codée par une portion de gène se trouvant dans le vecteur de transformation (vecteur pMOS dans ce mémoire). Dans les

bactéries transformées, il y aura complémentation intragénique lors de l'assemblage des peptides α et α' inactifs qui vont donner une galactosidase fonctionnelle.

Le site multiple de clonage du vecteur pMOS est intégré, par construction, en phase dans une partie peu importante du gène lac Z sans perturber l'activité de la β -galactosidase. Le phénomène de complémentation intragénique sera possible si le vecteur pMOS ne contient pas d'insert. Par contre, si le vecteur contient un insert, la région codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase sera disruptée et la complémentation intragénique alors rendue impossible car le peptide α ne peut plus former une β -galactosidase fonctionnelle en s'associant au peptide α' .

Lors de l'addition d'IPTG et de X-Gal, les bactéries transformées avec des vecteurs refermés sur eux-mêmes ou avec des vecteur contenant un petit morceau d'insert produiront une β -galactosidase fonctionnelle et apparaîtront bleues. Dans le cas de bactéries transformées avec le vecteur contenant l'insert, il n'y aura pas de β -galactosidase fonctionnelle et les colonies formées par celles-ci apparaîtront blanches.

Protocole

- Etaler les bactéries transformées sur le milieu solide LBA contenant l'antibiotique adéquat, ainsi que 35 μ l d'IPTG (stock à 20 mg/ml) et 35 μ l de X-Gal (stock à 20 mg/ml)
- Incuber les cellules à 37°C pendant une nuit
- Repiquer les colonies blanches sur un nouveau milieu LBA contenant l'antibiotique adéquat, l'IPTG et l'X-Gal

1.11. Réaction de séquençage par PCR

1.11.1. Pré-amplification de l'insert avec les amorces spécifiques du vecteur

Cette étape permet d'amplifier spécifiquement le segment de plasmide dans lequel se trouve l'insert à séquencer. Cette amplification se fait grâce à deux amorces

spécifiques du vecteur. Dans le cas du vecteur pMOS, les amorces utilisées sont REVERSE et FORWARD. Dans le cas du vecteur pET, les amorces utilisées sont T7 promoter et T7 terminator.

Réaction type de pré-séquençage :

1 µl d'ADN plasmidique
1 µl d'amorce droite (3.3 pmoles)
1 µl d'amorce gauche (3.3 pmoles)
5 µl de dNTP (stock à 2 mM)
5 µl de tampon de PCR avec magnésium
1 unité enzymatique de Taq polymérase
36 µl H₂O

Avec les amorces FORWARD et REVERSE

T7 Promoter et T7 Terminator

1 cycle	1 minute à 96°C	1 cycle	1 minute à 96°C
30 cycles	30 secondes à 96°C 15 secondes à 45°C 4 minutes à 60°C	25 cycles	30 secondes à 96°C 30 secondes à 50°C 4 minutes à 60°C

1.11.2. Purification du produit d'amplification (QIAquick Nucleotide Removal Kit)

Cette étape permet de débarrasser l'ADN pré-séquéncé des dNTP, des amorces, de l'enzyme et des petits produits d'amplification. Cette étape est indispensable au bon fonctionnement de la suite de la réaction de séquençage (voir protocole point 1.5).

1.11.3. Réaction de séquençage

Réaction type

5 µl d'ADN purifié à séquencer

1 µl d'amorce de séquençage gauche ou droite (3.3 pmoles)

4 µl de mix de séquençage (Terminator Ready Reaction Mix, PE Applied Biosystems)

Pour le protocole d'amplification, se référer au point 1.11.1.

1.11.4. Purification de l'ADN séquencé

- Ajouter 1 µl d'acétate de sodium 3 M et 25 µl d'éthanol à 98 % (maintenu à -20°C) à l'échantillon
- Mélanger délicatement avec une pipette et transvaser la solution dans un tube Eppendorf de 1.5 ml. Vortexer et incuber 10 minutes dans la glace
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 20 minutes à 4°C (minifuge)
- Eliminer le surnageant (culot invisible) en retournant délicatement les tubes sur du papier absorbant et laisser s'écouler le liquide pendant quelques minutes
- Ajouter 125 µl d'éthanol à 75% (maintenu à -20°C). Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (minifuge)
- Eliminer le surnageant (culot invisible) en retournant délicatement les tubes sur du papier absorbant en laisser s'écouler le liquide pendant quelques minutes
- Sécher le culot au speed-vac pendant 5 minutes (culot invisible)
- Les échantillons sont séquencés par le séquenceur automatique ABIPRISM 337 ADN Sequencer de Perkin Elmer

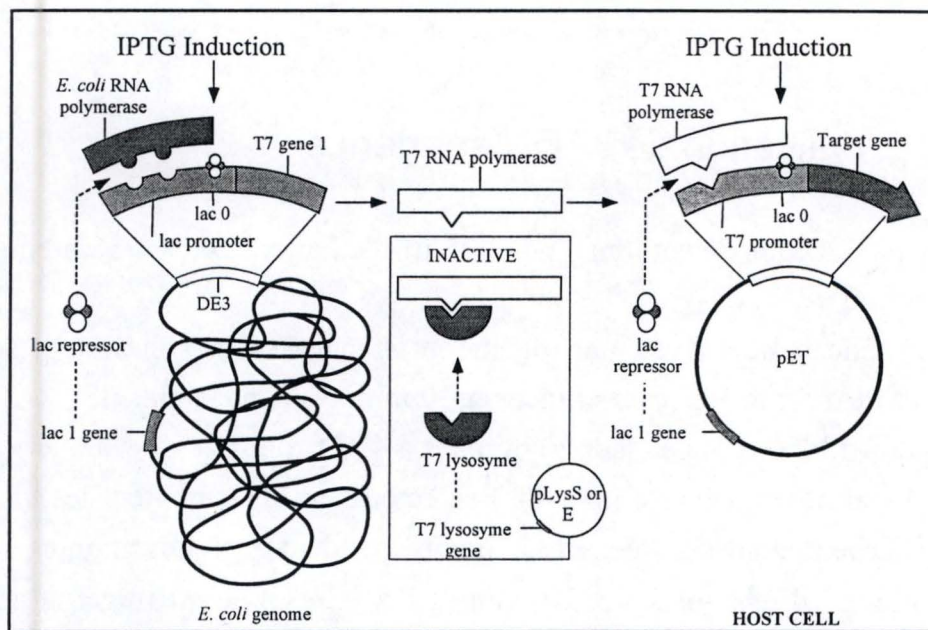


Figure 18 : Modèle de l'expression des inserts clonés dans le vecteur pET-15b

2. Méthodes relatives à l'analyse des protéines

2.1. Induction de l'expression de l'insert

Les cellules BL-21 (DE3) contiennent le gène codant pour la T7 RNA polymérase qui permet la surexpression des inserts (*figure 18*). Ce gène est sous la dépendance du promoteur lac UV5 qui est inductible par l'IPTG. L'ajout d'IPTG à de bactérie BL-21 (DE3) va donc permettre la production en grande quantité de la protéines d'intérêt codée par l'insert.

Solution

- IPTG (solution stock à 100 mM)

Protocole

- Ensemencer 50 ml de milieu LB (200 µg/ml d'ampicilline) avec une colonie bactérienne dont on désire extraire les protéines. Incuber la culture à 37°C sous agitation pendant une nuit
- Mesurer régulièrement la DO₆₀₀ au spectrophotomètre. Lorsque celle-ci atteint 0.600, induire la production de la protéine d'intérêt en ajoutant de l'IPTG (stock à 100 mM) à une concentration finale de 1 mM
- Poursuivre l'incubation pendant 3 heures à 37°C sous agitation

2.2. Extraction des protéines des bactéries BL-21 (DE3)

Solutions

- Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 2 mM
- Lysozyme (stock 10 mg/ml)
- Triton X-100 1 %
- 5 X SDS gel-loading buffer (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, dithiothreitol 500 mM, SDS 10 % bleu de bromophénol 0.5 %, glycérol 50 %)

Protocole

- Après induction de la culture bactérienne, collecter les cellules induites par centrifugation pendant 5 minutes à 5000 rpm
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 2 mM
- Ajouter du lysozyme (stock 10 mg/ml) préparé dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 2 mM) à une concentration finale de 100 µg/ml. Ajouter 0.5 ml de Triton X-100 1%. Incuber 15 minutes à 30°C
- Soniquer (sonicateur BANDELIN, Soniplus) la solution bactérienne dans un bain de glace, 5 pulses de 10 secondes. Centrifuger à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364)
- Séparer le surnageant du culot. Resuspendre le culot (fraction insoluble) dans 200 µl de 1X SDS gel-loading buffer. Ajouter 1 volume de 2X SDS gel-loading buffer au surnageant (fraction soluble)

2.3. Extraction des protéines de chicorée

Solution

- Tampon d'extraction (Tris 50 mM pH 6.8, β-mercaptoéthanol 1 %, glycérol 15 %)

Protocole

- Peser 300 mg de feuilles ou de racine de chicorée et les mettre dans des tubes Falcon de 50 ml contenant 50 mg de Polyvinyl-Polypyrrolidone (PVP) insoluble
- Placer les Falcons dans de la glace plus de l'eau
- Ajouter 1.5 ml de tampon d'extraction dans chacun des Falcons
- Homogénéiser 2 minutes à l'ultra-turrax en gardant les Falcons dans la glace et l'eau
- Centrifuger les Falcons à 4000 rpm à 4°C (Centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364)
- Récupérer les surnageants dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml et centrifuger pendant 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C
- Récupérer délicatement les surnageants dans des nouveaux tubes Eppendorf de 1.5 ml

2.4. Electrophorèse SDS-PAGE (méthode de Laemmli)

Les protéines extraites des souches bactériennes ont été analysée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Ce type de gel est le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide et de bis-acrylamide. Les deux catalyseur que sont l'amonium persulfate et le TEMED vont induire la polymérasation des monomères en libérant des radicaux libres.

Le gel de polyacrylamide, ainsi que le tampon, contiennent du SDS, un détergent qui, en excès, et en présence de β -mercaptoéthanol (un réducteur de pont disulfure), va dérouler les protéines et les charger négativement de manière uniforme. Les protéines étant toutes chargées négativement, leur migration dans le gel de polyacrylamide sera inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

2.4.1. Gel

Solution

- 1X SDS tampon de chargement (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, dithiothréitol 100 mM, SDS 2 % bleu de bromophénol 0.1%, glycérol 10 %)
- Tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM, glycine 250 mM pH 8.3, SDS 0.1 %)
- SDS 10 %
- Amonium persulfate 10 %
- Tris 1.5 M pH 8.8
- Tris 1 M pH 6.8
- TEMED

Composition du gel SDS-Page

Gel d'empilement 5 %

Pour un gel de 4 ml :

H ₂ O	2.7 ml
30 % acrylamide mix	0.67 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.5 ml
10 % SDS	0.04 ml
10 % amonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml

Gel de migration 15 %

Pour un gel de 5 ml

Pour un gel de 40 ml (grand gel)

H ₂ O	2.3 ml	9.2 ml
30% acrylamide mix	5.0 ml	20.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	10.0 ml
10% SDS	0.1 ml	0.4 ml
10 % amonium persulfate	0.1 ml	0.4 ml
TEMED	0.004 ml	0.016 ml

Marqueurs de taille

BIO-RAD :

Myosine	203 kDa
β-galactosidase	116 kDa
Albumine bovine	83 kDa
Ovalbumine	48.7 kDa
Anhydrase carbonique	33.4 kDa
Inhibiteur de trypsine	28.2 kDa
Lysozyme	20.7 kDa
Aprotinine	7.6 kDa

Pharmacia Biotech :

Phosphorylase b	94 kDa
Albumine bovine	64 kDa
Ovalbumine	43 kDa
Anhydrase carbonique	30 kDa
Inhibiteur de trypsine	20.1 kDa
α-lactalbume	14.4 kDa

Protocole

- Monter les plaques d'électrophorèse en suivant les instructions du fournisseur (espaceurs de 0.75 mm d'épaisseur)
- Préparer le gel de migration en ajoutant les deux catalyseurs (APS et TEMED) en dernier lieu
- Couler le gel entre les deux plaques de verre. Raccourcir le gel avec un peu d'éthanol pour favoriser la polymérisation
- Après polymérisation, enlever l'éthanol et préparer le gel d'empilement en ajoutant les deux catalyseurs (APS et TEMED) en dernier lieu
- Placer le peigne et couler le gel d'empilement
- Après polymérisation complète du gel d'empilement, enlever le peigne et rincer les puits avec quelque ml de tampon d'électrophorèse
- Monter les plaques sur le support d'électrophorèse et disposer celui-ci dans la cuve (Mini-PROTEAN II BIO-RAD) en suivant les instruction du fournisseur
- Remplir les compartiments supérieur et inférieur avec le tampon d'électrophorèse
- Préparer les échantillons à analyser en y ajoutant une quantité adéquate de tampon de chargement
- Déposer 15 µl d'échantillon par puits
- Mettre la cuve sous une tension de 150 V

2.4.2. Visualisation des protéines

Coloration au bleu de Coomassie

Solution

- Solution de coloration du gel : bleu de Coomassie (Brillant Blue R250) 0.1 %, méthanol 40 %, acide acétique 10 %, H₂O 50 %
- Solution de décoloration du gel : méthanol 40 %, acide acétique 10 %, H₂O 50 %

Protocole

- Plonger le gel dans la solution de coloration pendant 30 minutes

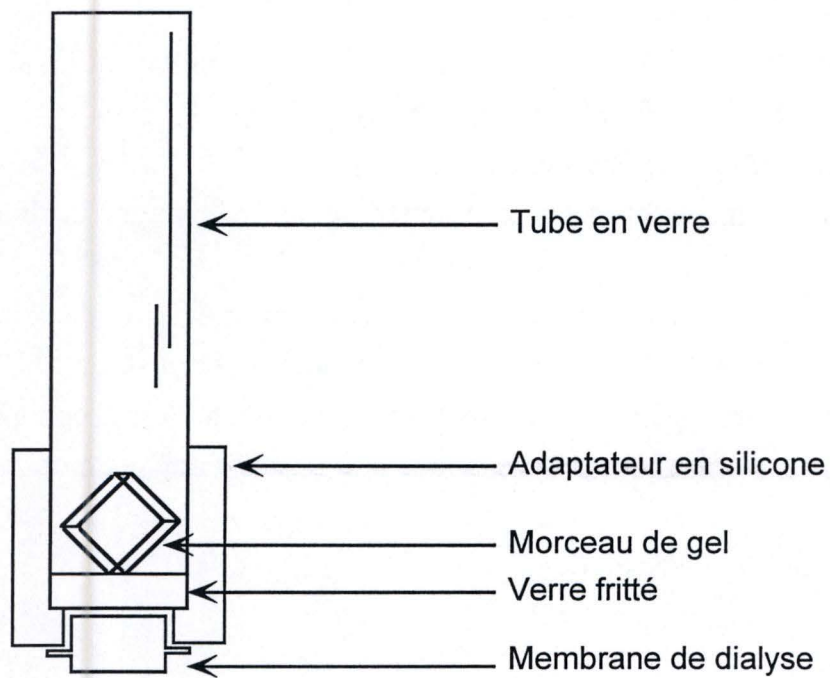


Figure 19 : Schéma de montage des tubes d'électro-élution

- Retirer le gel de la solution de coloration, le plonger dans la solution de décoloration et le laisser décolorer en renouvelant plusieurs fois la solution

Coloration à l'argent

Solution et protocole

Plonger le gel dans

- Fixateur 1 (Méthanol 50 %, acide acétique glacial 10 %) pendant 30 minutes
- Fixateur 2 (Méthanol 5 %, acide acétique glacial 7 %) pendant 30 minutes
- Fixateur 3 (Glutaraldéhyde 10 %) pendant 30 minutes
- H₂O distillée pendant 2 heures (avec des changements fréquents)
- H₂O distillée pendant 30 minutes
- Dithiothréitol 10 mg/ml pendant 30 minutes
- AgNO₃ 0.1 % pendant 30 minutes
- Rincer le gel avec quelques ml d'H₂O distillée
- Développeur (Na₂CO₃ 3%, formaldéhyde 50 µl/100 ml) jusqu'à ce que les protéines apparaissent
- Acide acétique 0.1 % pendant 10 minutes pour permettre l'arrêt de la réaction

2.5. Elution des protéines à partir d'un gel SDS-PAGE

Solutions

- Tampon d'élution Tris-glycine (25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3, 0.1 % SDS)

Protocole :

- A partir d'un grand gel SDS-PAGE (voir quantité de réactifs dans le chapitre 2.2.1.), découper la bande d'intérêt après coloration au bleu de Coomassie.
- Chauffer les membranes de dialyse dans du tampon d'élution au moins 1 heure à 60°C
- Placer un verre fritté au fond d'un tube en verre (*figure 19*)

- Placer une membrane au fond de l'adaptateur en silicone (*figure 19*)
- Remplir l'adaptateur en silicone avec du tampon d'élution et enlever les bulles d'air
- Placer l'adaptateur en silicone sur le tube en verre (*figure 19*)
- Remplir le tube avec les morceaux de gels (jusqu'à 1/3 de la hauteur du tube)
- Placer les tubes sur le support de la cuve
- Remplir de tampon d'élution les compartiments inférieur et supérieur de la cuve
- Eluer les protéines à 10 mA/tube jusqu'à ce que le gel soit totalement décoloré
- Lorsque l'élution est terminée, enlever le tube du support de la cuve. Retirer le tampon qui reste dans le tube en verre, ainsi que l'adaptateur en silicone
- Avec une pipette, récolter le liquide retenu par la membrane

2.6. Purification sur résine His-Bind (Novagen) et digestion à la thrombine

Solutions et tampons utilisés

- Tampon de chargement (8 X) : 400 mM NiSO₄
- Tampon d'élution (4 X) : 4 M imidazole, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH 7.9
- Tampon de lavage (8 X) : 480 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9
- Tampon de liaison (8 X) : 40 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9
- Tampon thrombine (1 X) : 2.5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 3.4

Préparation de la résine

- Déposer 1 ml de résine dans un Falcon de 50 ml. Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C
- Enlever le surnageant. Ajouter 3 volumes d'H₂O distillée. Mélanger pendant 5 minutes à 4°C
- Centrifuger pendant 2 minutes à 4000 rpm à 4°C. Enlever le surnageant
- Ajouter 5 volumes de tampon de chargement 1 X et centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C
- Enlever le surnageant et ajouter 3 volumes de tampon de liaison 1 X. Mélanger pendant 5 minutes à 4°C
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C et enlever le surnageant

Purification par lot de la protéine cible et digestion à la thrombine

- A la résine préparée, ajouter 3 volumes de tampon de liaison 1 X ainsi que les protéines à purifier
- Incuber pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Enlever le surnageant
- Ajouter 10 volumes de tampon de chargement 1 X et centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C
- Enlever le surnageant et laver 2 fois la résine avec 6 volumes de tampon de lavage 1 X
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Enlever le surnageant et laver 2 fois la résine avec 6 volume de tampon d'élution 1 X
- Incuber pendant 1 heure à 4°C
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minute à 4°C et récupérer le surnageant
- Aliquoter le surnageant dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml dont le capuchon a été préalablement troué
- Refermer les tubes Eppendorf sur une membrane de dialyse (Medicell international, 10000)
- Dialyser une nuit dans le tampon thrombine 1 X sous agitation à 4°C
- Digérer les protéines dialysées avec x unités de thrombine (Novagen) à 37°C pendant 7 heures

2.7. Immunisation des lapins

L'immunisation des lapins a été réalisée avec 1 ml de mélange protéines/adjuvant. Ce mélange se compose de 1 volume de protéines électro-éluées et de 1 volume d'adjuvant QuilA (Spikoside, Isoteck product). Des rappels sont effectués toutes les deux semaines après la première injection

2.8. Dot blot et Western blot

2.8.1. Epuisement d'un polysérum

L'épuisement des polyséras en présence de protéines d'*E.coli* est réalisée pour "neutraliser" les anticorps dirigés contre *E.coli* que le lapin aurait produits au cours de son existence.

- Réaliser l'extraction des protéines à partir d'une culture liquide de *E.coli* transformée avec le vecteur pET-15b ne contenant pas l'insert et induite par IPTG
- Ajouter aux protéines extraites un certain volume de polysérum (en fonction de la dilution que l'on veut obtenir)

2.8.2. Dot blot

Le dot blot est utilisé pour vérifier rapidement la présence d'anticorps dirigés contre la protéine cible. En pratique, les protéines sont directement déposées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond™-C extra, Amersham) et incubées en présence du polysérum à tester.

Solutions et tampon utilisés

- Solution de saturation : Tween-20 0.1 % dans TBS
- TBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl et 3 g Tris)
- Solution de révélation : 10 ml méthanol, 60 mg HRP (Horse Raddish Peroxydase, BIO-RAD), 50 ml TBS et 30 µl d'H₂O₂ (Merck)

Protocole

- Humidifier la membrane avec le tampon TBS
- Déposer 5 µl de l'extrait bactérien à analyser
- Saturer la membrane pendant une nuit, à 4°C, avec la solution de saturation Tween-20 0.1 %

- Rincer la membrane dans le tampon TBS
- Incuber la membrane, à température ambiante, pendant 1 heure avec le polysérum adéquat (épuisé ou non, naïf ou rappel) et dilué de façon appropriée
- Laver la membrane trois fois, à température ambiante, avec le tampon TBS
- Incuber la membrane pendant 1 heure, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (Amersham) et dilué de manière appropriée
- Laver la membrane trois fois, à température ambiante, avec le tampon TBS
- Révéler la membrane avec la solution de révélation

2.8.3. Transfert de protéines d'un gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose

Solution

- Tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % MeOH)

Protocole

- Séparer le gel d'empilement du gel de migration. Equilibrer le gel de migration dans le tampon de transfert pendant 10 minutes
- Couper les papiers buvards et la membrane de nitrocellulose (HybondTM-C extra, Amersham) à la dimension du gel de migration
- Humidifier la membrane avec de l'eau distillée puis tremper celle-ci dans le tampon de transfert pendant 5 minutes
- Assembler la cassette de transfert dans le tampon de transfert en évitant les bulles d'air (voir schéma)
- Remplir la cuve (Hoefer TE 50X) avec du tampon de transfert jusqu'au niveau des électrodes
- Placer un barreau magnétique dans le fond de la cuve et connecter celle-ci avec un bain thermostaté à une température de 15°C
- Connecter la source de courant à la cuve de transfert. Les conditions de transfert sont 1.0A et 100V pendant 2 heures
- Après 2 heures, déconnecter la source de courant et retirer la cassette de la cuve
- Placer le gel dans du bleu de Coomassie pour vérifier si le transfert a eu lieu
- Pour visualiser les protéines et les étalons, utiliser une solution de Ponceau S (Sigma, P-7170) ou une solution d'encre de chine

2.8.4. Visualisation des protéines transférées

2.8.4.1. Encre de chine

La visualisation avec l'encre de chine va faire apparaître les bandes représentant les protéines transférées en noir tandis que le fond de la membrane sera de couleur grise. Le traitement de la membrane avec l'encre de chine est un traitement permanent.

Solutions

- KOH 1 %
- Solution Tween-20 (0.3 % Tween-20 dans TBS, pH 7.4)
- Encre de chine 0.1 % (Pelikan 17 black) dans la solution Tween-20

Protocole

- Incuber la membrane 5 minutes dans la solution de KOH 1 % et sous agitation
- Rincer deux fois la membrane pendant 15 minutes avec TBS et sous agitation
- Laver la membrane 3 fois pendant 30 minutes à 37°C avec la solution Tween-20 et sous agitation
- Laver la membrane 2 fois pendant 30 minutes à température ambiante avec la solution Tween-20 et sous agitation
- Incuber la membrane avec la solution d'encre de chine 0.1 % pendant la nuit et sous agitation
- Rincer la membrane deux fois à température ambiante avec la solution Tween-20
- Incuber la membrane à température ambiante avec la solution Tween-20 pour décolorer la membrane
- Laisser sécher la membrane

2.8.4.2. Ponceau S

Le rouge Ponceau est une solution qui permet de visualiser les protéines transférées. Celles-ci vont apparaître sous forme de bandes de couleur rouge. Ce traitement étant non permanent, la membrane peut ensuite être utilisée lors de western blot comme c'est le cas dans ce mémoire.

Solution

- Solution Ponceau S (Ponceau S 0.1 %, acide acétique 5 %)

Protocole

- Incuber la membrane 30 minutes avec la solution Ponceau S
- Décolorer la membrane dans de l'eau distillée jusqu'à ce que le fond de la membrane soit blanc
- Repérer l'emplacement des marqueurs de taille
- Décolorer complètement la membrane avec de l'eau distillée

2.8.5. Western blot

Solutions

- Solution de saturation : Tween-20 0.1 % dans TBS
- TBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl et 3 g Tris)
- Solution de révélation : 10 ml méthanol, 60 mg HRP, 50 ml TBS et 30 μ l d' H_2O_2)

Protocole

- Transférer les protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose (voir point 2.8.3.)
- Saturer la membrane pendant une nuit, à 4°C, avec la solution de saturation Tween-20 0.1 %
- Rincer la membrane dans le tampon TBS
- Incuber la membrane, à température ambiante, pendant 1 heure avec le polysérum adéquat (épuisé ou non, naïf ou rappel) et dilué de façon appropriée
- Laver la membrane trois fois, à température ambiante, avec le tampon TBS
- Incuber la membrane pendant 1 heure, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (Amersham) et dilué de manière appropriée
- Laver la membrane trois fois, à température ambiante, avec le tampon TBS
- Révéler la membrane avec la solution de révélation

IV. Résultats et discussion

1. Bref rappel des objectifs du mémoire

Le but de ce mémoire est l'obtention d'anticorps dirigés contre deux fragments de protéines b-ZIP végétales, pCREB480 et pCREB540 de *Cichorium intybus* (la chicorée à inuline). Ces fragments de protéines codés par les inserts CREB480 et CREB540 ont été clonés lors d'un précédent travail (Bellefontaine, 1995). Pour obtenir ces sondes immunologiques, les séquences CREB480 et CREB540 ont été clonées dans un vecteur d'expression pET-15b qui permet la surexpression des protéines d'intérêt. Les protéines ainsi produites ont été injectées à des lapins pour la production d'anticorps.

2. Les séquences CREB

2.1. Résumé des travaux antérieurs

Le clonage et le séquençage d'ADNc codant pour des protéines b-ZIP végétales homologues à CREB ont été réalisés au laboratoire (Bellefontaine, 1995). L'objectif de ce travail précédent était de caractériser, chez *Cichorium intybus* (la chicorée à inuline), un gène correspondant à un facteur de transcription homologue à la protéine mammalienne CREB. Deux fragments de gènes, l'un de 546 bp et l'autre de 488 bp, ont été clonés chez *Cichorium intybus*. Chacun de ces deux fragments code pour le domaine b-ZIP riche en résidus basiques et le domaine leucine zipper du facteur de transcription. La comparaison de ces séquences avec d'autres séquences de protéines b-ZIP végétales a montré que celles-ci appartiennent à une famille de facteurs de transcriptions se liant spécifiquement à des séquences très proche des CREs (5'-TGACGTCA-3') qui sont des éléments promoteurs dépendant de l'AMPc chez les animaux.

2.2. Séquençage complet des deux clones

Les deux clones CREB480 et CREB540 ont été séquencés pour vérifier la séquence de CREB540 et pour compléter la séquence de CREB480. Les séquences nucléotidiques et en acides aminés sont reprises ci-dessous. Dans les séquences en acides aminés, le domaine basique est en grisé et le domaine b-ZIP est encadré (les leucines sont en gras). Au niveau des protéines b-ZIP végétales, on retrouve 3 leucines dans le domaine b-ZIP pour 4 chez le facteur CREB animal.

2.2.1. CREB480

Séquence nucléique

```
ATGTCCAACAACCTTGAAAGTAGCAGAATGAAATTGAGCCAACCTTGAGCAAGAGCTTCAACGAGCAAGA  
CAGCAGGGCATCTTCATTTCAAGTTCAGGCGAACAATCTCAATCAACAAGTGGAAACGGGGCATCATC  
TTTTTCATGTTGAATATTCACGGTGGTTAGAAGAACAAAATAGGCGAATTAGTGAACCTAAGAGAAGCTG  
TGAGTTCACATGCTGCTGATGGTGAACCTTCGTCTTATTGTTGATGGTGTCATCACACATTATGAAGAT  
ATTTTTAGAATAAAAAATGATGCTGCAAAGCGGATGTTTTTCATATTTTATCAGGCATGTGGAAAAC  
GCCTGCAGAACGGTGTTCCTTTGGTTAGGTGGATTCCGTTTCATCAGAACTTCTCAAGTTACTTATAA  
CCAATTAGAGCCATTAACAGAGCAACAATTATTAGCCATCAACAACCTGCAACAAACATCACAACAA  
GCAGAAGACGCC
```

Séquence en acides aminés

```
AYVQQLESSRMKLSQLEQELQRARQQGIFISSSGEQSQSTSGNGASSFHVEYSRWLEEQNRRISELRE  
AVSSHAADGELRLIVDGVITHYEDIFRIKNDAAKADVHILSGMWKTPAERCFLWLGGFRSSELLKLL  
ITQLEPLTEQQLLAINNLQOTSQQAEDA
```

2.2.2. CREB540

Séquence nucléique

```
AAGCTTAACCGTGAGGCTGCACGAAAAAGCCGTTTGAGAAAAAGGCCTATGTTTCAGCAGTTGGAAGC  
TAGTAGACTGAAATTGCTTCATCTAGAACAAGAACTTGAACAAACTAAAGCACAGGCTGCTTTATTGA  
GTGGTGGAGTCAATGCTAGTCATCTTGGATTACCTGGAACCTACAACTCAGGAATTGCTGCATTTGAG  
ATGGAGTATGAGCATTGGGTTGAAGAACAAAATAAAAAACTAATGCTTTAAAGACGGCTTTACATGC  
ACCTTTACCTGATACAGAGCTTGATGTACTTGTGAAGGACACGTTGAACCACTATGCAAATCTTTTCA  
CCATTAAAGCAACTGCAGCAAAGGTTGATGTTTGTATCTCATATCGGGCATGTGGAAAACATCGACC  
GAAAGACTTTTCTTGTGGATTGGAAGATTCGTCCTTCTGAGCTTCTTAAGGTTCTTGTACCACAAC  
TAAGCTCTTGGACCAACAATCTCACGATCTTTGTAACCTCATTCAAGCGTGCCAACAAGCAGAAGACG  
CC
```

PCREB480 1 -----
 Vicia 1 -MGSRRIRVSFEDEKGAETGMPSFN-SDDACYTEGNTVDAFHVSDFGAFTFGQPYRIEDAV
 Mais 1 MESRRGGSSAAAAEDAGGAMPSFGPTQHAIRADVNSMQPSRVTDFFTGALAQSAGFRIED
 Ble 1 -----
 Aral 1 -----
 Ara2 1 -----
 Tabac 1 -----
 pdt 1 -----
 Soja 1 -----
 PCREB540 1 -----

PCREB480 1 -----
 Vicia 59 ALSGNSNSVFNLSKVSQGTISPGPAHISTLGKFPSTLDKSPLENQTEPFTHRLQLTKLQS
 Mais 61 LANLNANALFN-LKPNSTIDNSPLQFGNYGKSISSHIN-TTEATTAFTTRIDPQLSAQ
 Ble 1 -----
 Aral 1 -----
 Ara2 1 -----
 Tabac 1 -----MGICDP
 pdt 1 -----MNSSTYTQFVASKRMGICDP
 Soja 1 -----MNSASPQFVSPRSMVYDP
 PCREB540 1 -----

PCREB480 1 -----
 Vicia 119 SNLSSSSILSVHIENQE--EFTMADASPRTDISTDVDTDDKNQRFDTNQSLFTVPVGS
 Mais 119 QTGAQPIILVALPTGNMENWGESAMADSPMTDTSTDPDTDERNQMFEOGLFTVAVPTAS
 Ble 1 -----MAEASPRTEETSTD-DTDEN-IMLEPG--NAALAVVSDS
 Aral 1 -----MADTSPRTDVSTDDTDHPDLGSEGA---LVNTAASDS
 Ara2 1 -----RTSVSTDGTDHNNLMFDEG---HLGIGASDS
 Tabac 7 IHQLGMWDDFN-SSFPSTSATMILEVD--KCLEQIPIMEKRFTLDNETEDTSHGTVGT-
 pdt 21 IHQIGMWGDFKSSFPDT---LILEVENFTCLENEPIMEKR--LENEIEEPSQVTVM-
 Soja 20 IHQISMWGEFGKSNGLS-----AAMPLIDEFTADMKFDSQSEDASHGILGE-
 PCREB540 1 -----

PCREB480 1 -----VQQLESS--RMKLSQLEQELQR
 Vicia 177 SDRSKDK---SDQKTLRRLAQNREAARKSRLR--KKAYVQLESS--RLKLTQLEQELQF
 Mais 179 SDKSRDK---LDQKTLRRLAQNREAARKSRLR--KKAYIQNLESS--RLKLTQLEQEFTL
 Ble 35 SDRSRDKNGDQFTKTMRRLAQNREAARKSRLR--KKAYVQLENS--RLKLTQLEQE--L
 Aral 36 SDRSKGK-MDQFTKTLRRLAQNREAARKSRLR--KKAYVQLENS--RLKLTQLEQE--L
 Ara2 30 SDRSKSK-MDQKTLRRLFTAQNREAARKSRLR--KKAYVQLENS--RLKLTQLEQE--L
 Tabac 63 SNRYEPETSKPVEKVLRLAQNREAARKSRLR--KKAYVQLENSKFTLKLQLEQE--L
 pdt 75 SNRYEPETTKRIDKVRRLAQNREAARKSRLRFTKKAYVQLENS--KLKLLQLEQE--L
 Soja 67 PNKYDQEASKPTDKIQRRLAQNREAARKSRLR--KKAYVQQLFTESSRLKLMQLEQE--L
 PCREB540 1 -----KLNREAARKSRLR--KKAYVQLEAS--RLKLLHLEQE--L
 + ++ + + ++ * * *

PCREB480 21 ARQ--QGI FISSSGEQSQ----STSGNGASSFHVEYS--RWLEEQRRI SELREAVSSHA
 Vicia 230 TRARQQGVFISSSGEQTH----SLSGNGAMQFDAEYA--RWLEEQRNRI NELRAAVNSHA
 Mais 232 QRARQQGIFISTSGDQP----QSTSGNGALAFDMEYA--RWLEEHNKHNELRAAVNAHA
 Ble 89 QRARQQGIFISSADQSHF--TSMGNGALAFDTEYA--RWLEEHNKHNELRAAVNAHA
 Aral 89 QRARQQGIFISSSGDQAHF--TAGDGFAMAFDVEYR--RWQEDKNRQMKELSSAIDSHA
 Ara2 83 QRARQQGVFISSSGDQAHF--TAGDGFAMAFDVEYR--RWQEDKNRQMKELSSAIDSHA
 Tabac 119 ERARKQGMCVGGVDASQLSYSGTASSGTAVFDMEYG--HWVEEQTRQTNDFTLRIALHS
 pdt 131 ERNRQQGLYVGDGLDASQIGCSGTANSGLIASFEMEYGFTHWVEEQDRQTD--LRNALNS
 Soja 123 ERARQQGMYIGGLDSNHLGFAGSVNSGITTFEMEYGFTHWVEEQDRQTD--LRNALNS
 PCREB540 36 EQTKAQAALLSGGVNASHLGLPGTTNSGIAFEMEYE--HWVEEQNKKTNA--LKTALHA

PCREB480 73 ADGEL--RLIVDGVITHYEDIFRIK--NDAAKADV FHILSG--MWKTPAERCFLWL--GG
 Vicia 284 SDTELRFMTIVDGI LAHYDEIFRLK--GVAAKADV FHLLSG--MWKTPAERCFLWL--GG
 Mais 286 GDNDFTLRCIVDSIMVHYDEIFKFK--GVAAKADV FHVLSG--MWKTPAERCFLWL--GG
 Ble 145 G--DTELRSVVEKIMSHYDEIFKQKFTGNAAKADV FHVLSG--MWKTPAERCFLWL--GG
 Ara1 145 G--DSELRIIVDGVMAHYEELFRIKFTSNAAKNDV FHLLSG--MWKTPAERCFLWL--GG
 Ara2 139 T--DSELRIIVDGVIAHYEELYRIKGNAAKSF TDV FHLLSG--MWKTPAERCFLWL--GG
 Tabac 177 QIGEAELRIIVDGYLNHYFDLFRMK--ATAAKADV LYIMSG--MWKTS AERFFMWIF TGG
 pdt 189 QMGEIELRLIVSCLNHYFDLFRMK--ATAANADV LYLMSTFTWKT SAERFFLWI--GG
 Soja 181 HIGDVELRLIVDGMMSHYAEMFRMK--SAAAKADV FYVMSG--MWKTTAERFF TSLWIGG
 PCREB540 92 PLPDEL DVLVKDTL NHYANLFTIK--ATAAKV DVCY LISG--MWKTS TERLFLWI--GR

PCREB480 125 FRSELLKLLITQL--EPLTEQQLLAINNLQQ--TSQQAEDA-----
 Vicia 338 FRSELLKLLV SQFTLEPLTEQQLMGITNLQQ--SSQQAEDALSQGMEA--LQQLAETL
 Mais 340 FRSELLKLLAFTGHLEPLTDQQLVGINLQQ--SSQQAEDALSQGMEA--LQQLAETL
 Ble 199 FRPSELLKLLST--QLEPLTEQQLSGICNLQOFTSSQQAEDALSQGMEA--LQQLAETL
 Ara1 199 FRSELLKLLAN--QLEPMTERQLMGINNLQOFTTSSQQAEDALSQGMES--LQQLADTL
 Ara2 193 FRSELLKLIAC--QLEPLTEQQLSDINNLQOFTTQQAEDALSQGM DN--LQQLADTL
 Tabac 233 FRPSELLKVLTP--HLELLTEQQLREVCNLTQ--SCQQAEDALSQGMVK--LHQILAEAV
 pdt 245 FRPSELLKVLTP--HVEPLSDQQIQEVSNLTQ--SCQQAEDALSQGMVKFTLHQILAEAV
 Soja 237 FHPSELLKVLGP--LIEPLTEQQLRNINYLQO--SCQQAEDALSQGM DK--LRQTLADSF
 PCREB540 146 FRPSELLKVLVP--QLKLLD--QQSHDL CNLIQ--ACQQAEDA-----

PCREB480 -----
 Vicia 394 STGAPSSSGS--SGNVANYMFTGQMAMAMGKLGHSRASFD---R-----L
 Mais 396 ASGSLGPAGP--SGNVANFTYMGQMAMAMGKLG TLENFLR--QADNLR LQTLQMQRILT
 Ble 255 AG-SIGSSSGSGSTGNVAN--YMGQMAMAMGKLG TLENFF TLSQADNLRQTLQMQRILT
 Ara1 255 SSGTLGSSSS---GNVAS--YMGQMAMAMGKLG TLEGFIRFTQADNLR LQTLQMQIRVLT
 Ara2 249 SSGTLGSSSS---GNVAS--YMGQMAMAMGKLG TLEGFIRQADNLRFTLQTYQQMVRLLT
 Tabac 287 AAGFTRLGEGN----YTL----PQMGPAIEKLEDLVR FVNQADHLRQETLQQMSRI LNTC
 pdt 301 AAG--TLGEG-----IIL----PQMTATIEKLEALVR FVNQADHLRQETLLQMSCI LAAH
 Soja 291 TVAAGQFM EG-----TYI----PQMTSAMEKLEDLVS FVKQADHLRQETLEQMSRI L TIR
 PCREB540 -----

PCREB480 -----
 Vicia 434 TICASRLYNKCTEY-----
 Mais 452 TRQSARALLAISDYFSRLRALFTSSLWLARP RE--
 Ble 312 TRQSARALLVISDYSSRLRALS--SLWLARP KE--
 Ara1 310 TRQSARALLAIHDYFSRLRALS--SLWLARP RE--
 Ara2 304 TRQSARALLAVHNYTLRLRALS--SLWLARP RE--
 Tabac 339 Q--AAQGLLALGEYFTFERLRVLSQWATRLREPT
 pdt 350 QFTSAQGLLALGEYF--KRLRALS SLWAGRLSEPA
 Soja 342 QAARCLLALFTGEYF--QRLRALS SLWSNRPREPA
 PCREB540 -----

Figure 20 : Alignement multiple des séquences correspondant aux fragments CREB480 et CREB540, et de plusieurs protéines b-ZIP végétales : *Vicia faba*, maïs, blé, *Arabidopsis thaliana* (séquence 1 et séquence 2), tabac, pomme de terre et soja.

Séquence en acides aminés

KLNREAARKSRLRKKAYVQQLLEASRLKLLHLEQELLEQTKAQAALLSGGVNASHLGLPGTTNSGIAAFE
MEYEHVVEEQNKKTNALKTALHAPLPDTELDVLVKDTLNHYANLFTIKATAAKVDVCYLISGMWKTST
ERLFLWIGRFRPSELLKVLVPQLKLLDQQSHDLCNLIQACQQAEDA

2.2.3. Alignement multiple des séquences

Un alignement des séquences en acides aminés des fragments protéiques codés par les inserts CREB480 et CREB540 a été réalisé avec différentes protéines CREB-like végétales (*figure 20*). Sur cet alignement multiple, les domaines basiques sont encadrés et les domaines leucine zipper sont ombrées (les leucines intervenant dans la dimérisation sont indiquées par un astérisque). Cet alignement a été réalisé avec l'algorithme Match-Box (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu..9331/multi-align/multi-align.html>)

3. Le clonage des séquences CREB dans pET-15b

Avant de réaliser le clonage des inserts CREB480 et CREB540 dans le vecteur pET-15b, les inserts sont clonés dans le vecteur pMOS qui permet une sélection plus aisée des recombinants grâce entre autres à la possibilité d'effectuer le test "blanc bleu".

3.1. Le vecteur pMOS

Le vecteur pMOS utilisé est un plasmide linéarisé possédant, à chaque extrémité, une thymine protrudante. Cette construction particulière permet le clonage direct des fragments d'ADN amplifiés par la Taq DNA polymérase (qui termine son élongation par une adénine protrudante).

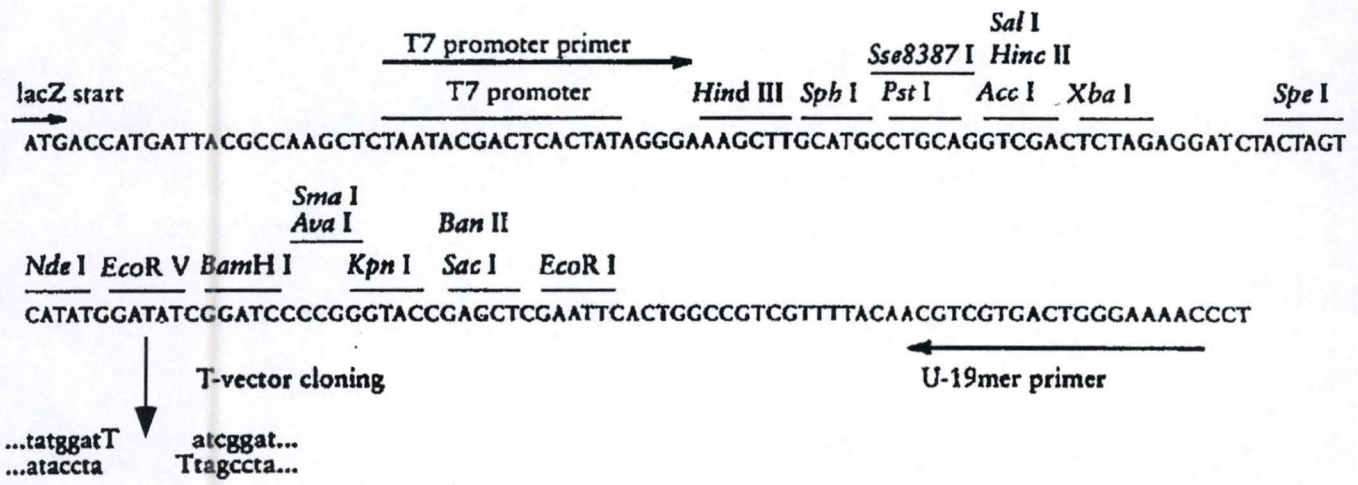
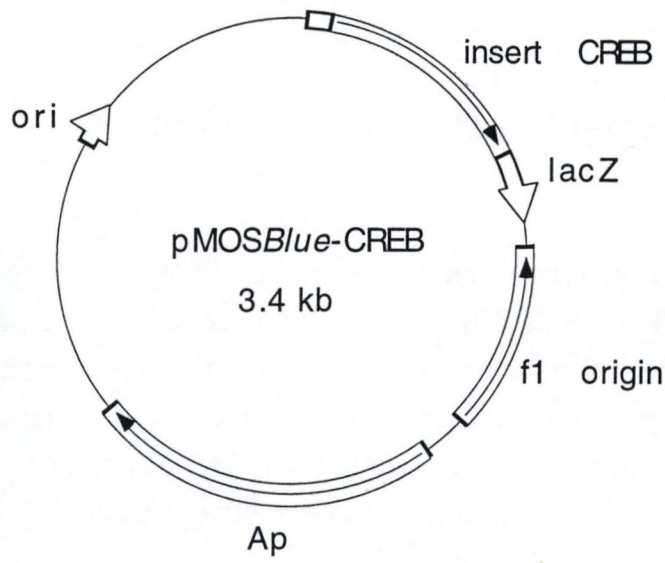


Figure 21 : Représentation schématique du plasmide pMOS contenant un insert CREB, et localisation du site de clonage des inserts

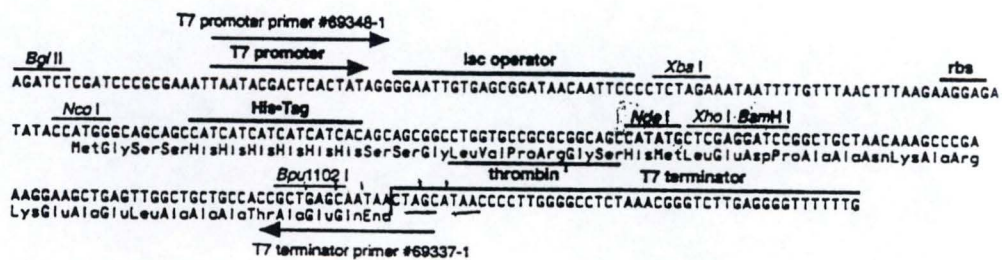
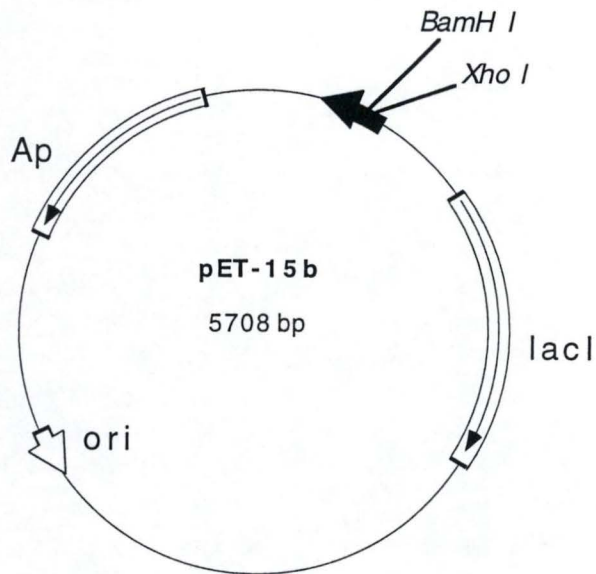


Figure 22 : Représentation schématique du plasmide pET-15b utilisé pour le clonage des inserts CREB480 et CREB540

Ce plasmide est porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline et permet de réaliser le test "blanc-bleu" en présence d'X-Gal et d'IPTG (*figure 21*).

3.2. Définition de nouvelles amorces

Le plasmide pET-15b (5708 bp) contient, au niveau de son site multiple de clonage, 3 sites de clonage possibles : *Xho I*, *BamH I* et *Nde I* (*figure 22*). Le clonage se réalise au niveau de deux sites de restrictions différents, ce qui permet de définir une bonne orientation pour l'insert. Au niveau du site de clonage se trouve une séquence adjacente (peptide "tag") qui va permettre la purification de la protéine. Dans le cas de ce mémoire, le peptide "tag" est une oligohistidine. Une fois la protéine digérée, le peptide tag peut être éliminé par digestion à la thrombine. La sélection des transformants contenant pET-15b s'effectuera sur un milieu avec ampicilline car le plasmide possède le gène de résistance à cet antibiotique.

Les clones CREB480 et CREB540 étant délimités chacun par des sites de restriction *EcoR I* et *Hind III*, il est nécessaire de changer ces sites de restriction pour les rendre compatibles avec les sites de clonage de pET-15b. De nouvelles amorces PCR ont été définies à partir des extrémités des fragments en y incorporant un site *Xho I* (amorce gauche) et un site *BamH I* (amorce droite). En plus du changement de site de restriction, il a été nécessaire de tenir compte de la phase de lecture imposée par le vecteur pET-15b. Les amorces reprises dans le tableau ci-dessous représentent les amorces utilisées

CR4	5'-CGG- <u>GAT-CCT</u> -CAG-GCG-TCT-TCT-GCT-TGT-TG-3' <i>BamH I</i>
CR6	5'-CCG- <u>CTC-GAG</u> -AAC-CGT-GAG-GCT-GCT-GCA-CGA-AAA-3' <i>Xho I</i>
CR7	5'-CCG- <u>CTC-GAG</u> -AAT-GTC-CAA-CAA-CTT-GAA-AGT-3' <i>Xho I</i>

Les amorces CR4 et CR7 ont été utilisées pour amplifier CREB480 (voir ci-dessous l'alignement des amorces avec les extrémités de l'inserts) :

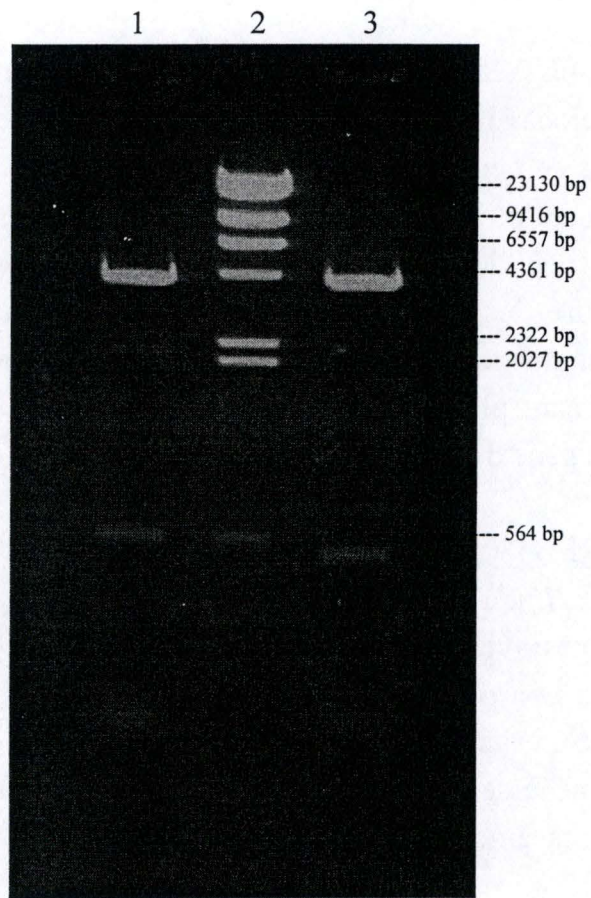


Figure 23 : Restriction des plasmides pSPORT, contenant l'insert CREB480 ou CREB540, avec les enzymes de restriction *Hind III* et *EcoR I*

Piste 1. Restriction de pSPORT-CREB540 par *EcoR I* / *Hind III*
 Piste 2. Marqueur de taille λ / *Hind III*
 Piste 3. Restriction de pSPORT-CREB480 par *EcoR I* / *Hind III*

Amorce CR7

Xho I
5' - CCGCTCGAGAATGTCCAACAACCTTGAAAGT - 3'
3' - TTACAGGTTGTTGAACTTTCATCGCCTTACTTTAA... - 5'

Amorce CR4

BamH I
5' - CGGGATCCTCAGGCGTCTTCTGCTTGTTG - 3'
3' - AGTCCGCAGAAGACGAACAACCTACAAACAACGTTCA... - 5'

Les amorces CR4 et CR6 ont été utilisées pour amplifier CREB540 (voir ci-dessous l'alignement des amorces avec les extrémités de l'inserts) :

Amorce CR6

Xho I
5' - CCGCTCGAGAACCGTGAGGCTGCTGCACGAAA - 3'
3' - TTGGCACTCCGACGACGTGCTTTTCGGCAAACCTCT... - 5'

Amorce CR4

BamH I
5' - CGGGATCCTCAGGCGTCTTCTGCTTGTTG - 3'
3' - AGTCCGCAGAAGACGAACAACCTACAAACAACGTTCA... - 5'

3.3. Amplification par PCR et clonage dans le vecteur pMOS

3.3.1. Vérification des clones de départ

Les bactéries *E.coli* qui avait été transformées lors d'un précédent mémoire avec le plasmide pSPORT (4109 bp) contenant soit l'insert CREB480 soit l'insert CREB540, ont été mises en culture dans du milieu LB-ampicilline. Les plasmides pSPORT ont été isolés par mini-préparation et restreints avec les enzymes *EcoR I* et *Hind III*. Les produits de digestion ont été analysés sur gel d'agarose 2 %. (*figure 23*). Comme prévu, les bandes correspondant aux inserts CREB480 (488 bp) et CREB540

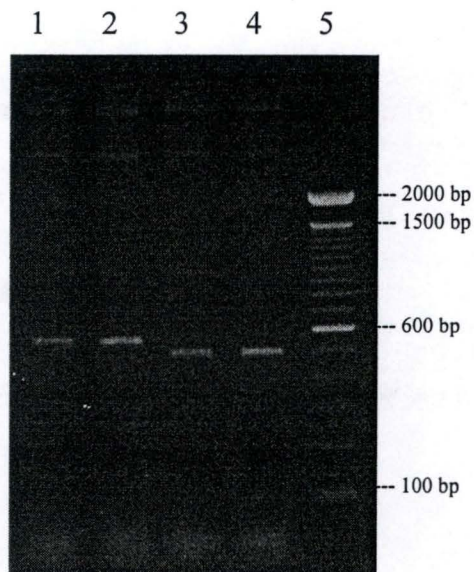


Figure 24 : Amplification par PCR des inserts CREB480 (avec les amorce CR4 et CR7) et CREB540 (avec les amorces CR4 et CR6)

Pistes 1 et 2. Amplification de CREB540 avec les amorces CR4 et CR6
Pistes 3 et 4. Amplification de CREB480 avec les amorces CR4 et CR7
Piste 5. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

(546 bp) apparaissent à leurs tailles respectives sur le gel. Le plasmide (4109 bp) restreint et séparé de son insert se retrouve également sur ce gel légèrement en dessous du marqueur de 4361 bp.

3.3.2. Amplification de CREB480 et CREB540 avec les amorces CR4, CR6 et CR7

Les inserts ont été amplifiés en quantités suffisantes pour pouvoir être clonés dans le vecteur pMOS (2.9 kb). CREB480 a été amplifié avec les amorces CR4 et CR7. CREB540 a été amplifié avec les amorces CR4 et CR6.

Le mélange PCR contient :

- 0,5 µl d'ADN cible
- 1 µl d'amorce gauche CR6 ou CR7
- 1 µl d'amorce droite CR4
- 1 µl de dNTP
- 5 µl de tampon PCR
- 1 µl de Taq DNA polymérase
- 41,5 µl d'H₂O

Les conditions PCR pour ces amplifications sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Etape	Température (°C)	Temps (min.)	Répétition
Dénaturation	94	1	
Dénaturation	94	1	25 cycles
Hybridation	55	1	
Elongation	68	3	
Terminaison	68	10	

Après réaction, le mélange PCR est déposé sur un gel d'agarose 2 % (*figure 24*). Les bandes correspondant aux inserts CREB480 et CREB540 se trouvent aux niveaux attendus sur le gel, à savoir entre 500 et 600 bp pour l'insert CREB540 et aux environs de 500 bp pour l'insert CREB480. Les amorces étant spécifiques aux inserts, il était normal que les bandes se trouvent à ces hauteurs. L'intensité des différentes bandes permet aussi de se rendre compte de l'efficacité de l'amplification.

3.3.3. Ligation des inserts dans pMOS

Les inserts amplifiés ont été purifiés par le kit QIAquick nucleotide removal. Une ligation des inserts isolés a été réalisée dans le vecteur pMOS par le kit pMOSBlue T-vector (*Amersham LIFE SCIENCE*).

Le mélange de ligation contient :

- 1 μ l de plasmide pMOS
- 1,5 μ l d'insert (CREB480 ou CREB540)
- 0,5 μ l d'ATP
- 0,5 μ l de DTT
- 0,5 μ l de T4 DNA ligase
- 1 μ l de tampon de ligation
- 5 μ l d' H_2O

Le mélange de ligation est placé 2 heures à 16°C

Des bactéries TOP10 compétentes ont été transformées avec le mélange de ligation. Celles-ci ont été étalées sur du milieu LB contenant de l'ampicilline (200 μ g/ml), du X-Gal et de l'IPTG, afin de réaliser le test blanc-bleu. Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies blanches ont été repiquées sur un milieu identique et replacées une nuit à 37°C.

3.3.4. Sélection et analyse des transformants

Les colonies blanches, après le double repiquage, sont testées par PCR sur colonie. Les colonies contenant CREB480 ont été testées avec les amorces CR4 et CR7. Les colonies contenant CREB540 ont été testées avec les amorces CR4 et CR6.

Le mélange PCR contient :

- Colonie bactérienne prélevée au moyen d'un embout stérile
- 1 μ l d'amorce gauche CR6 ou CR7
- 1 μ l d'amorce droite CR4
- 1 μ l de dNTP
- 5 μ l de tampon PCR
- 1 μ l de Taq DNA polymérase
- 42 μ l d' H_2O

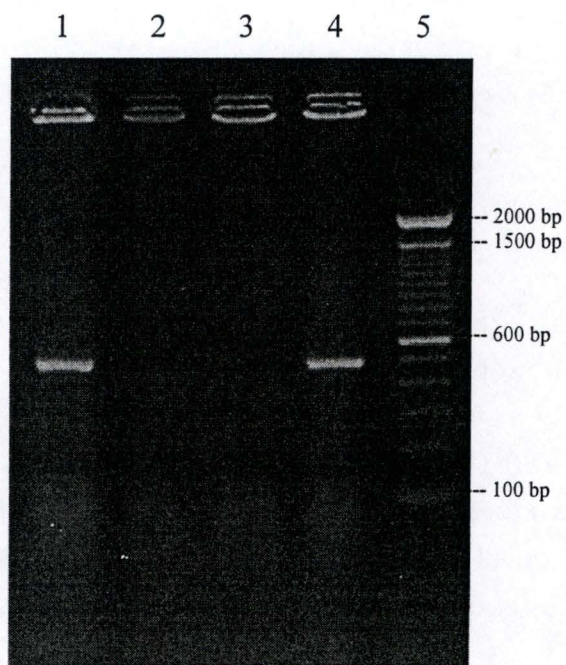


Figure 25 : PCR sur colonies transformées avec le vecteur pMOS contenant l'insert CREB480

Pistes 1 à 4. PCR sur colonie CREB480 avec les amorces CR4 et CR7
Piste 5. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

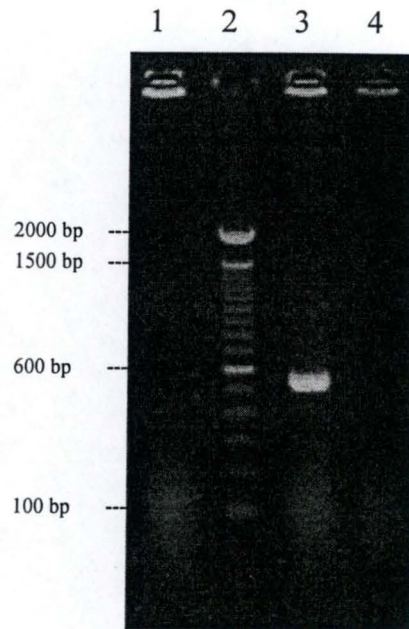


Figure 26 : PCR sur colonies transformées avec le vecteur pMOS contenant l'insert CREB540

Pistes 1, 3 et 4. PCR sur colonie CREB540 avec les amorces CR4 et CR6
Piste 2. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

Les conditions PCR pour ces amplifications sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Etape	Température (°C)	Temps (min.)	Répétition
Dénaturation	94	1	
Dénaturation	94	1	25 cycles
Hybridation	55	1	
Elongation	68	3	
Terminaison	68	10	

Les mélanges d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 2 % (*figures 25 et 26*). Comme le montrent les gels, toutes les colonies blanches testées par PCR avec les amorces spécifiques des inserts CREB480 et CREB540 ne répondent pas positivement par une amplification. Les faux positifs obtenus lors du test "blanc bleu" pourraient être dus à la ligation d'insert incomplet, mais de taille suffisante pour empêcher la complémentation (voir matériel et méthodes point 1.10.4.), dans le plasmide. En ce qui concerne les colonies où l'on observe une amplification, les bandes correspondantes aux inserts se retrouvent aux niveaux attendus sur le gel.

3.3.5. Séquençage

Le séquençage des inserts CREB480 et CREB540 a permis de vérifier leur séquence et la présence des sites de restrictions *Xho I* et *BamH I* nécessaires pour le clonage dans le plasmide pET-15b.

Le séquençage a été réalisé depuis des plasmides purifiés à partir des colonies positives isolées précédemment.

Une réaction de pré-séquençage a été réalisée pour amplifier uniquement la partie du plasmide contenant l'insert. Ce pré-séquençage a été réalisé avec les amorces FOR et REV spécifiques du vecteur pMOS et reprises ci-dessous :

FOR	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
REV	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

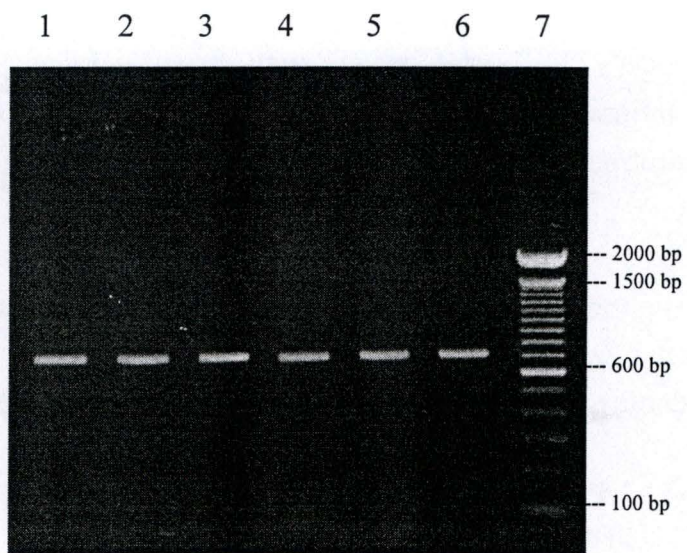


Figure 27 : Réaction de pré-amplification en vue du séquençage de l'insert CREB480

Pistes 1 à 6. Pré-séquençage de CREB480 avec les amorce FOR et REV
Piste 7. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

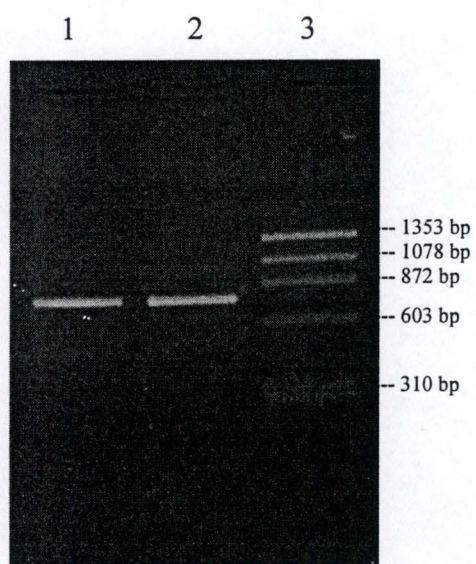


Figure 28 : Réaction de pré-amplification en vue du séquençage de l'insert CREB540

Pistes 1 à 2. Pré-amplification de l'insert CREB540 avec les amorces FOR et REV
Piste 3. Marqueur de taille ϕ X174 / *Hae III*

Les conditions PCR pour le pré-séquençage sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Etape	Température (°C)	Temps (sec)	Répétition
Dénaturation	96	60	
Dénaturation	96	30	30 cycles
Hybridation	45	15	
Elongation	60	4	

Une fraction du mélange PCR a été analysée sur un gel d'agarose 2 % (*figures 27 et 28*). Dans le cas des deux inserts CREB480 et CREB540, les différentes bandes apparaissent à des tailles supérieures à celles attendues (546 et 488 bp). Cette différence de taille est due à l'emploi des amorces FOR et REV qui sont des amorces internes du vecteur.

Après cette réaction de pré-amplification, les inserts ont été purifiés avec le kit QIAquick nucleotide removal puis séquencés.

Le mélange PCR de séquençage contient :

- 6 µl d'ADN purifié à séquencer
- 1 µl d'amorce de séquençage FOR ou REV
- 8 µl de mix de séquençage
- 5 µl d'H₂O

Les conditions PCR pour le séquençage sont identiques à celles du pré-séquençage.

Les mélanges PCR ont été purifiés puis séquencés au moyen d'un séquenceur automatique ABIPRISM 337 ADN Sequencer de Perkin Elmer. Les séquences ci-dessous reprennent un exemple de séquençage : les fragments CREB480 et CREB540 sont encadrés; les sites de restriction *Xho I* et *BamH I* sont en gras.

CREB480

Séquençage avec l'amorce FOR

Xho I

```

...GATCCGATCCGCTCGAGAATGTCCAACAACTTGAAAGTAGCGGAATGAAATTGAGCCAACTTGAGCA
AGAGCTTCAACGAGCAAGACAGCAGGGCATCTTCATTTCAAGTTCAGGCGAACAATCTCAATCAACAA
GTGGAAACGGGGCATCATCTTTTCATGTTGAATATTCACGGTGGTTAGAAGAACAAA...
  
```

Séquençage avec l'amorce REV

BamH I

```
...AGTCATATGGATTTCGGGATCCTCAGGCGTCTTCTGCTTGTGTGATGTTGTTGCAAGTTGTTGATG
GCTAATAATTGTTGCTCTGTTAATGGCTCTAATTGGGTTATAAGTAACTTGAGAAGTTCTGATGAACG
GAATCCACCTAACCAAAGAAAACACCGTTCTGCAGGCGTTTCCACATGCCTGATAAAAATATGAAA...
```

CREB540

Séquençage avec l'amorce FOR

Xho I

```
...AGGAGATCCGATTTCGTCCTCGAGAACCGTGAGGCTGCACGAAAAAGCCGTTTGGAAAAAAGGCCTA
TGTTTCAGCAGTTGGAAGCTAGTAGACTGAAATTGCTTCATCTAGAACAAGAACTTGAACAACTAAAG
CACAGGCTGCTTTATTGAGTGGTGGAGTCAATGCTAGTCATCTTGGATTACCTGGAACACTACAAA...
```

Séquençage avec l'amorce REV

BamH I

```
...CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCTACTAGTCATATGGATTTCGGGATCCTCAGGCGTCTTCTGCTTGT
TGGCAGCTTGAATGAGGTTACAAAGATCGTGAGATTGTTGGTCCAAGAGCTTAAGTTGTGGTACAAG
AACCTTAAGAAGCTCAGAAGGACGAAATCCTCCAATCCACAAGAAAAGTCTTTCGGTCGATGTTTTTC...
```

3.4. Clonage dans le vecteur pET-15b

Après avoir vérifié les séquences des inserts dans le vecteur pMOS, ces derniers ont été clonés dans le vecteur pET-15b. Pour permettre ce clonage, les inserts seront restreints avec les enzymes *Xho I* et *BamH I*.

3.4.1. Purification et restriction des séquences CREB480 et CREB540

La première étape de ce clonage a été l'isolement, par midi-préparation d'ADN, des vecteurs pMOS contenant les inserts CREB480 et CREB540. Les plasmides purifiés ont été restreints avec les enzymes de restriction *Xho I* et *BamH I*. Cette

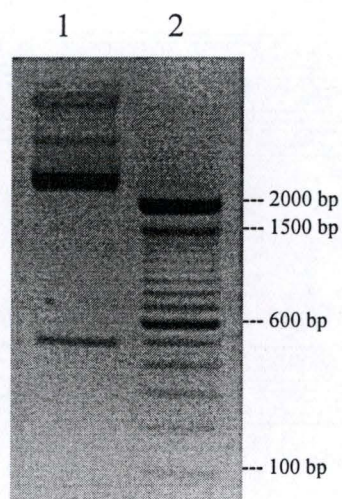


Figure 29 : Restriction du vecteur pMOS, contenant l'insert CREB480, avec les enzymes *Xho I* et *BamH I*

Piste 1. Restriction de pMOS-CREB480 avec les enzymes *Xho I* et *BamH I*
Piste 2. Marqueur de taille 100 bp

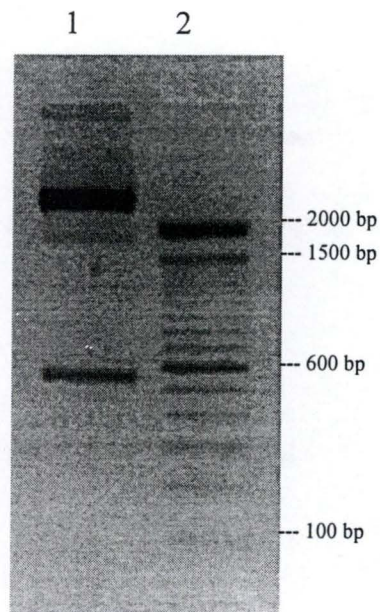


Figure 30 : Restriction du vecteur pMOS, contenant l'insert CREB540, avec les enzymes *Xho I* et *BamH I*

Piste 1. Restriction de pMOS-CREB540 avec les enzymes *Xho I* et *BamH I*
Piste 2. Marqueur de taille 100 bp

restriction permet de vérifier l'intégrité des sites de restriction et de la séquence des inserts.

Le mélange de restriction contient :

- 10 µl (20 µg) de plasmide pMOS contenant l'insert (CREB480 ou CREB540)
- 2 µl de tampon de restriction (Réact 2)
- 2 µl d'enzyme *Xho I*
- 6 µl d'H₂O

Le mélange de restriction a été incubé à 37°C pendant 5 heures. On rajoute ensuite au mélange de restriction 2 µl d'enzyme *BamH I*, 2 µl de NaCl 1 M et 16 µl d'H₂O. Ce mélange a été incubé 5 heures de plus à 37°C.

Une fraction de l'échantillon restreint a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (**figures 29 et 30**). On observe, sur les gels, à la fois une bande correspondant à l'insert et à la fois la bande correspondant au vecteur pMOS. Ceci signifie que l'intégrité des sites de restriction a été respectée. De plus, en ce qui concerne les bandes correspondant aux inserts, celles-ci se trouvent aux niveaux attendus. Ces deux résultats confirment ceux obtenus par séquençage.

La bande correspondante à l'insert est ensuite découpée du gel et l'ADN est purifié avec le kit QIAEX II. Les inserts ainsi isolés sont maintenant prêts à être clonés dans le vecteur pET-15b.

3.4.2. Clonage des inserts dans le plasmide pET-15b

Le clonage dans le vecteur pET-15b permet de surexprimer les fragments de protéines encodées par CREB480 et CREB540. Pour la production des protéines cibles, le plasmide recombinant doit être transféré dans une souche bactérienne contenant une copie chromosomiale du gène pour la T7 RNA polymérase (DE3). Dans cette souche, le promoteur lac UV5 dirige la transcription de la T7 RNA polymérase. Ce promoteur est inductible par l'IPTG. De ce fait, le gène restera silencieux (ou faiblement produit) jusqu'à l'ajout d'IPTG dans la solution bactérienne. Cet ajout va permettre la synthèse de T7 RNA polymérase et ainsi la production de la protéine cible. Ce produit peut alors représenter plus de 50 % de la production totale de la

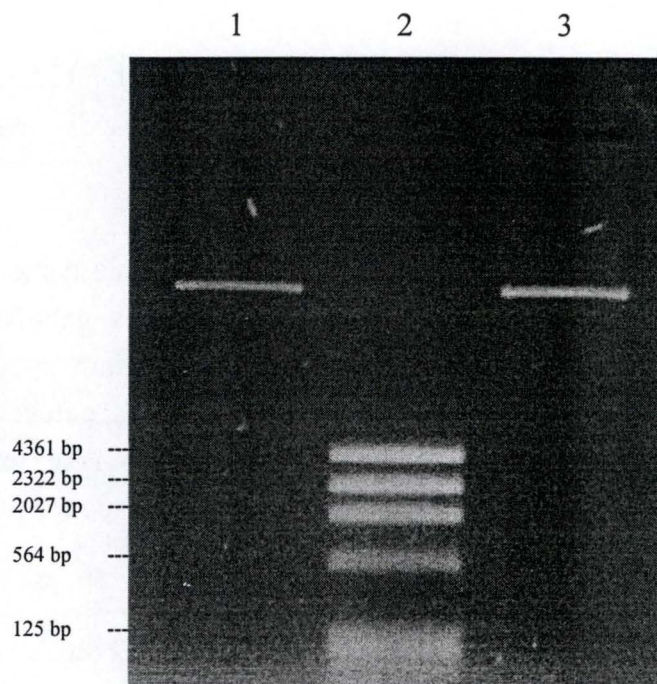


Figure 31 : Restriction du plasmide pET-15b avec les enzymes *Xho I* et *BamH I*

Pistes 1 et 3. Restriction pET-15b par *Xho I* / *BamH I*
Piste 2. Marqueur de taille ϕ X174 / *Hae III*

cellule transformée. Ce système permet également de maintenir le gène inséré silencieux car dans un premier temps, la transformation avec pET-15b avec insert se fera dans un hôte ne possédant pas la T7 RNA polymérase. Le fait de pouvoir maintenir l'insert silencieux est intéressant au cas où le produit serait potentiellement toxique pour la cellule transformée. Lorsque la quantité en protéine d'intérêt augmente dans la cellule, le surplus va être dirigé vers les corps d'inclusion qui contiennent également d'autres protéines propres à *E.coli*. Et comme dans la plupart des cas les corps d'inclusions purifiés peuvent être utilisés directement comme antigènes, cette dernière propriété se révèle également très intéressante.

3.4.2.1. Purification du plasmide pET-15b

Les vecteurs pET-15b ont été isolés, par mini-préparation, à partir des colonies bactériennes transformées et précédemment mises en cultures. Les plasmides purifiés ont été restreints avec les enzymes de restriction *Xho I* et *BamH I*.

Le mélange de restriction contient :

- 5 µl (10 µg) de plasmide pET-15b
- 2 µl de tampon de restriction (Réact 2)
- 2 µl d'enzyme *Xho I*
- 11 µl d'H₂O

Le mélange de restriction a été placé 5 heures à 37°C. On rajoute ensuite au mélange de restriction 2 µl d'enzyme *BamH I*, 2 µl de NaCl 1 M et 16 µl d'H₂O. Ce mélange a été incubé 5 heures de plus à 37°C.

Une fraction du mélange de restriction a été analysé sur gel d'agarose 2 % (*figure 31*). La taille du fragment *Xho I* / *BamH I* est de 5 bp.

La bande correspondant au vecteur pET-15b est découpée du gel et l'ADN est purifié avec le kit QIAEX II.

3.4.2.2. Ligation des inserts dans le plasmide pET-15b

La ligation des inserts CREB480 et CREB540 dans le plasmide pET-15b a été réalisée avec le kit pMOSBlue T-vector (*Amersham LIFE SCIENCE*).

Le mélange de ligation contient :

- 1 μ l de plasmide pET-15b (125 ng)
- 1 μ l d'insert (CREB480 ou CREB540)
- 0,5 μ l d'ATP
- 0,5 μ l de DTT
- 0,5 μ l de T4 DNA ligase
- 1 μ l de tampon de ligation
- 5,5 μ l d'H₂O

Le mélange de ligation a été placé 2 heures à 16°C

3.4.3. Transformation des bactéries TOP10 avec le vecteur pET-15b contenant l'un des inserts

Une première transformation a été réalisée avec des bactéries de la souche TOP10. Cette souche ne contient pas la T7 RNA polymérase et ne peut donc pas produire la protéine clonée dans le vecteur pET-15b. Ne connaissant pas l'éventuelle toxicité des protéines p480 et p540, cette étape préliminaire permet de réaliser le "bon" clonage tout en gardant les inserts silencieux.

Les bactéries transformées sont alors déposées sur milieu LB avec ampicilline. Les bactéries transformées qui se développent sur milieu LB et ampicilline ont été analysées par PCR avec les amorces spécifiques des inserts CREB480 (CR4 et CR7) et CREB540 (CR4 et CR6).

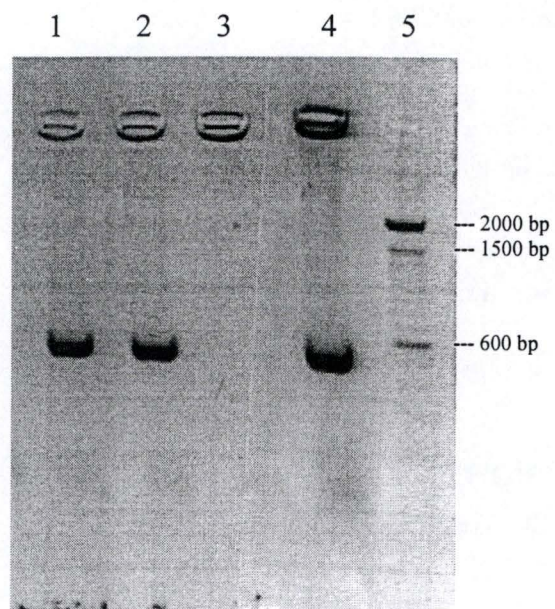


Figure 32 : PCR sur colonies TOP10 transformées avec le vecteur pET-15b contenant l'insert CREB480

Pistes 1 à 4. PCR sur colonie CREB480 avec les amorces CR4 et CR7
Piste 5. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

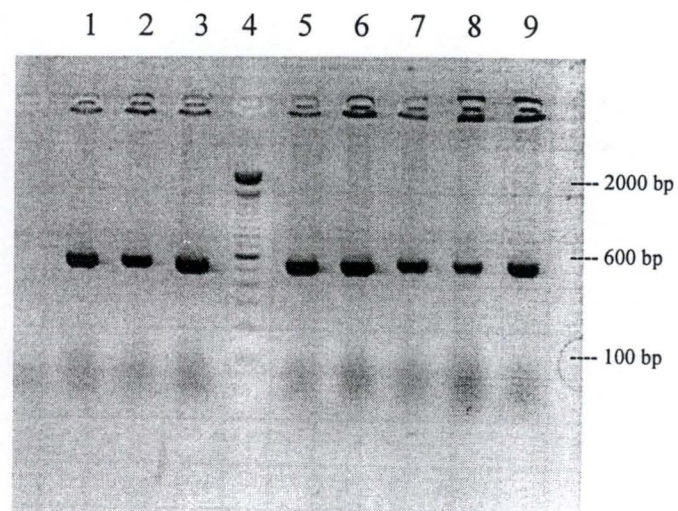


Figure 33 : PCR sur colonies TOP10 transformées avec le vecteur pET-15b contenant l'insert CREB540

Pistes 1 à 3 et 5 à 9. PCR sur colonie CREB540 avec les amorces CR4 et CR6
Piste 4. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

Le mélange PCR contient :

Colonie bactérienne prélevée au moyen d'un embout stérile
1 μ l d'amorce gauche CR6 ou CR7
1 μ l d'amorce droite CR4
1 μ l de dNTP
5 μ l de tampon PCR
1 μ l de Taq DNA polymérase
42 μ l d'H₂O

Les conditions PCR pour ces amplifications sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Etape	Température (°C)	Temps (min.)	Répétition
Dénaturation	94	1	
Dénaturation	94	1	25 cycles
Hybridation	55	1	
Elongation	68	3	
Terminaison	68	10	

Après réaction, le mélange PCR est déposé sur un gel d'agarose 2 % (*figures 32 et 33*). Les bandes obtenues sur ces gels correspondent bien à la taille attendue pour les inserts CREB480 et CREB540. Toutes les colonies ne répondent pas positivement à ce test malgré une première sélection sur ampicilline. Les faux positifs sont certainement dus à la présence du plasmide pET-15b ne contenant qu'un fragment de l'insert non complémentaire avec les amorces spécifiques à celui-ci.

3.5. Séquençage des inserts et vérification de la phase

Le séquençage des inserts CREB480 et CREB540 dans le plasmide pET-15b permet la vérification de leur séquence et de la phase imposée par le plasmide pET-15b. Le séquençage des inserts CREB480 et CREB540 a été réalisé avec les amorces T7 promoter et T7 terminator spécifiques du vecteur pET-15b.

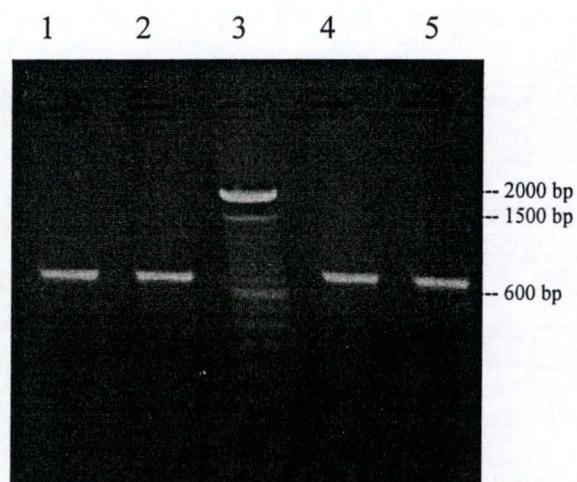


Figure 34 : Réaction de pré-amplification en vue du séquençage des inserts CREB480 et CREB540

Pistes 1 à 2. Pré-séquencage de CREB480 avec les amorce T7 promoter et T7 terminator
Piste 3. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder
Pistes 4 à 5. Pré-séquencage de CREB540 avec les amorce T7 promoter et T7 terminator

T7 Promoter	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-G-3'
T7 terminator	5'-GGC-GAC-TCG-TTA-TTG-ATC-3'

La première étape du séquençage consiste en une réaction de pré-amplification des inserts avec les amorces T7 promoter et T7 terminator spécifiques du plasmide pET-15b. Les différentes étapes et conditions du pré-séquençage et du séquençage sont identiques à celles réalisées au point 3.3.5. sauf la température d'hybridation des amorces qui est ici de 50°C.

Une fraction du mélange de pré-séquençage est analysée sur gel d'agarose 2 % (*figure 34*). Les différentes bandes apparaissent à des tailles supérieures à celles attendues (546 et 488 bp). Cette différence de taille est due à l'emploi des amorces T7 promoter et T7 terminator qui sont des amorces internes du vecteur pET-15b.

Un exemple de résultats obtenus lors du séquençage des différents clones se trouve ci-dessous. La partie encadrée correspond à l'insert. Le séquençage montre que les inserts clonés sont bien en phase.

CREB480

Amorce T7 promoter

Xho I

His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asn Val Gln
 ...CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATG**CTCGAG**AATGTCCAAC
 AACTTGAAAGTAGCGGAATGAAATTGAGCCAACCTGAGCAAGAGCTTCAACGAGCAAGACAGCAGGGC
 ATCTTCATTTCAAGTTCAGGCGAACAATCTCAATCAACAAGTGGAAACGGGGCATCATCTTTTCATGT
 TGAATATTCACGGTGGTTAGAAGAACAAA...

Amorce T7 terminator

BamH I

...ACTTGTTAGACGGAG**GATCC**TCAGGCGTCTTCTGCTTGTGATGTTTGTGCAAGTTGTTGATGG
 CTAATAATTGTTGCTCTGTTAATGGCTCTAATTGGGTATAAGTAACTTGAGAAGTTCTGATGAACGG
 AATCCACCTAACCAAGAAAACACCGTTCTGCAGGCGTTTTCCACATGCCTGATAAAATATGAAAAA...

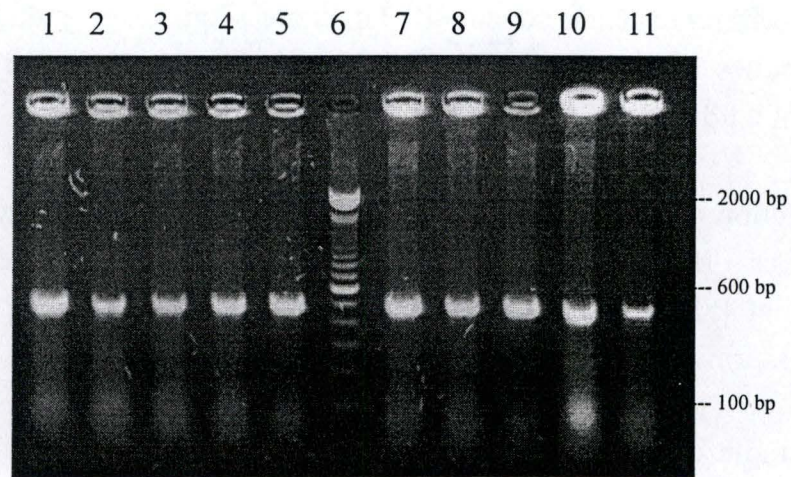


Figure 35 : PCR sur colonies BL-21 (DE3) transformées avec le plasmide pET-15b contenant l'insert CREB480

Pistes 1 à 5 et 7 à 11. PCR sur colonie BL-21 CREB480 avec les amorces CR4 et CR7
Piste 6. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

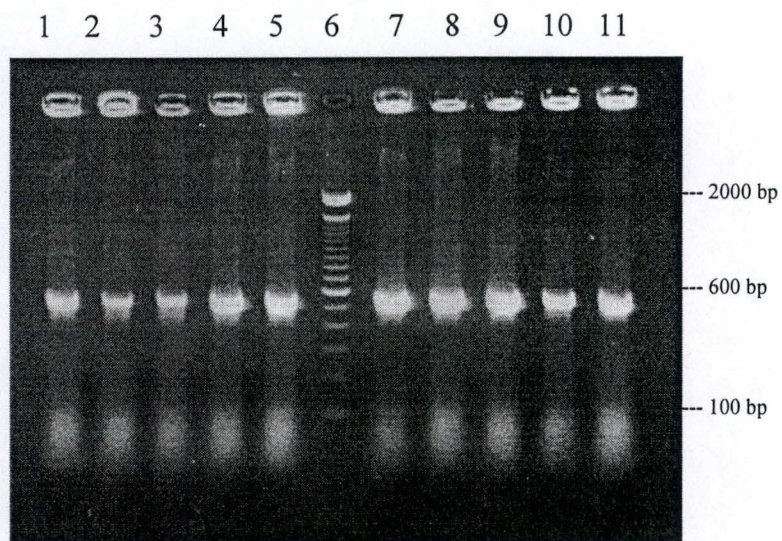


Figure 36 : PCR sur colonies BL-21 (DE3) transformées avec le plasmide pET-15b contenant l'insert CREB540

Pistes 1 à 5 et 7 à 11 . PCR sur colonie BL-21 CREB540 avec les amorces CR4 et CR6
Piste 6. Marqueur de taille 100 bp DNA ladder

CREB540

Amorce T7 promoter

Xho I

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asn Arg Glu
...CATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTCGAGAACCGTGAGG
CTGCACGAAAAAGCCGTTTGAGAAAAAAGGCCTATGTTTCAGCAGTTGGAAGCTAGTAGACTGAAATTG
CTTCATCTAGAACAAGAAGCTTGAACAAACTAAAGCACAGGCTGCTTTATTGAGTGGTGGAGTCAATGC
TAGTCATCTTGGATTACCTGGAACACTACAAA...

Amorce T7 terminator

BamHI

...ACTTGTTAGACGGAGGATCCTCAGGCGTCTTCTGCTTGGTGGCAGCTTGAATGAGGTTACAAAGAT
CGTGAGATTGTTGGTCCAAGAGCTTAAGTTGTGGTACAAGAACCCTTAAGAAGCTCAGAAGGACGAAAT
CCTCCAATCCACAAGAAAAGTCTTTCGGTTCGATGTTTTCCAACCTGCCCGATATGAGATACCAAAC...

3.6. Passage en BL-21 (DE3)

Après avoir sélectionné les bactéries TOP10 contenant les constructions pET-CREB adéquates, les plasmides correspondants ont été introduits dans une souche BL-21 (DE3). Les cellules BL-21 (DE3) contiennent la T7 RNA polymérase qui permet la surexpression des fragments de protéines p480 et p540 encodés par les inserts CREB480 et CREB540.

Les vecteurs pET-15b contenant les inserts ont été isolés par mini-préparation d'ADN et utilisés pour électro-transformer des bactéries BL-21 (DE3). Les bactéries transformées ont été déposées sur milieu LB avec ampicilline.

Les colonies bactériennes qui se sont développées sur ce milieu ont été analysées par PCR avec les amorces spécifiques des inserts (CR4 et CR7 pour CREB480, CR4 et CR6 pour CREB540) (*figures 35 et 36*). La taille des bandes observées sur les deux gels correspond à la taille attendue des inserts CREB480 et CREB540. A ce stade-ci, nous avons les séquences CREB480 et CREB540 insérées dans le vecteur d'expression pET-15b cloné dans les bactéries BL-21 (DE3).

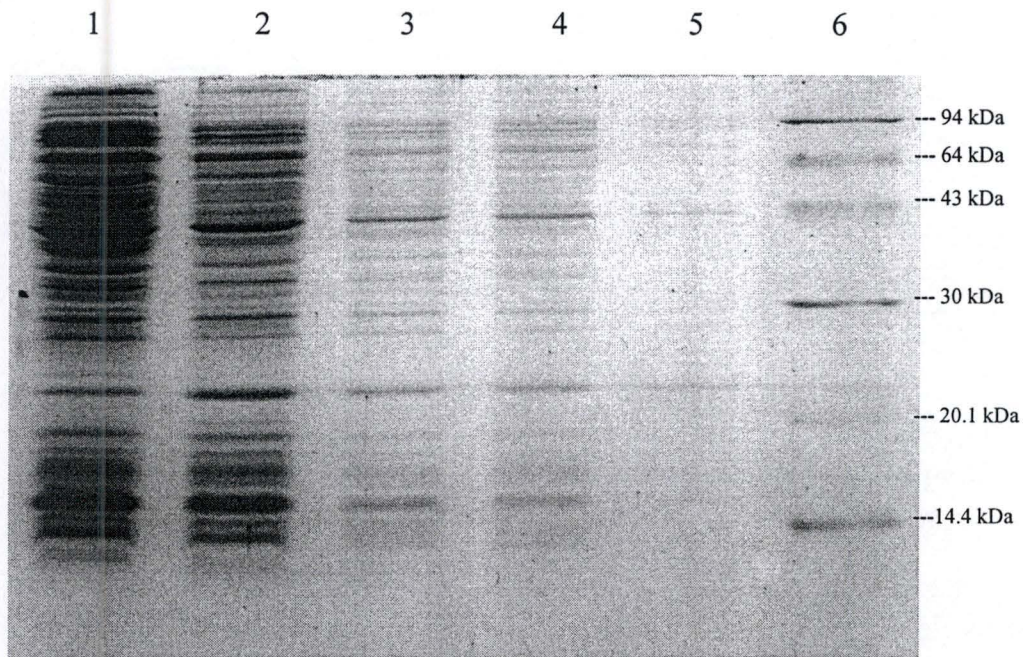


Figure 37 : Fraction soluble d'un extrait protéique d'une culture, induite par IPTG, de BL-21 transformées avec le plasmide pET-15b contenant l'insert CREB480

Piste 1. Fraction soluble d'une culture non induite
Piste 2. Fraction soluble d'une culture induite non diluée
Piste 3. Fraction soluble d'une culture induite diluée 2 X
Piste 4. Fraction soluble d'une culture induite diluée 50 X
Piste 5. Fraction soluble d'une culture induite diluée 100 X
Piste 6. Marqueur de poids moléculaire Pharmacia Biotech

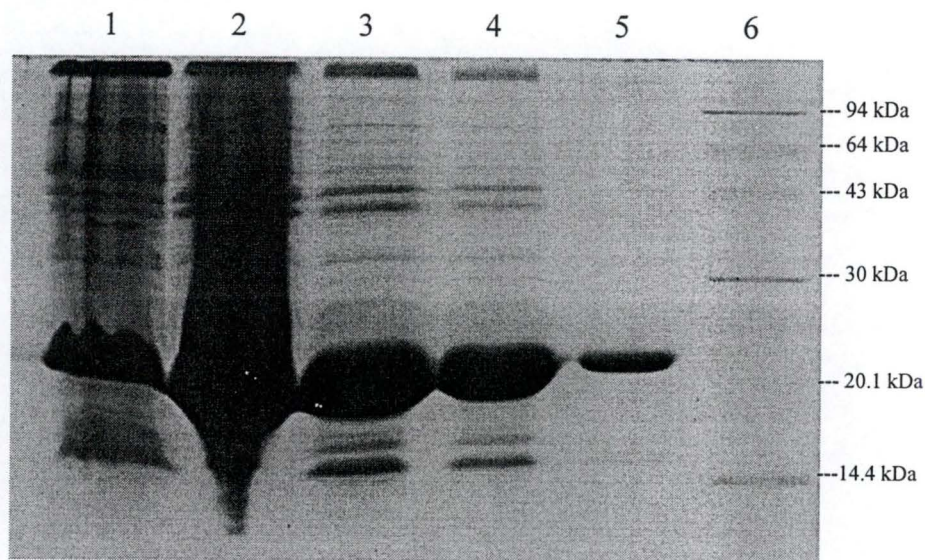


Figure 38 : Fraction insoluble d'un extrait protéique d'une culture, induite par IPTG, de BL-21 transformées avec le plasmide pET-15b contenant l'insert CREB480

Piste 1. Fraction insoluble d'une culture non induite
 Piste 2. Fraction insoluble d'une culture induite non diluée
 Piste 3. Fraction insoluble d'une culture induite diluée 2 X
 Piste 4. Fraction insoluble d'une culture induite diluée 50 X
 Piste 5. Fraction insoluble d'une culture induite diluée 100 X
 Piste 6. Marqueur de poids moléculaire Pharmacia Biotech

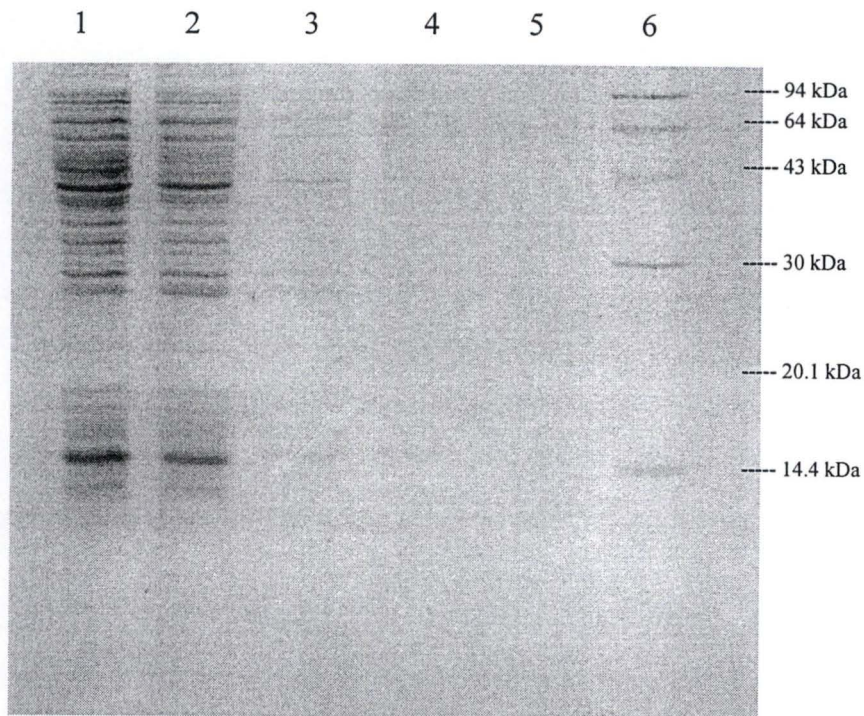


Figure 39 : Fraction soluble d'un extrait protéique d'une culture, induite par IPTG, de BL-21 transformées avec le plasmide pET-15b contenant l'insert CREB540

Piste 1. Fraction soluble d'une culture non induite
 Piste 2. Fraction soluble d'une culture induite non diluée
 Piste 3. Fraction soluble d'une culture induite diluée 2 X
 Piste 4. Fraction soluble d'une culture induite diluée 50 X
 Piste 5. Fraction soluble d'une culture induite diluée 100 X
 Piste 6. Marqueur de poids moléculaire Pharmacia Biotech

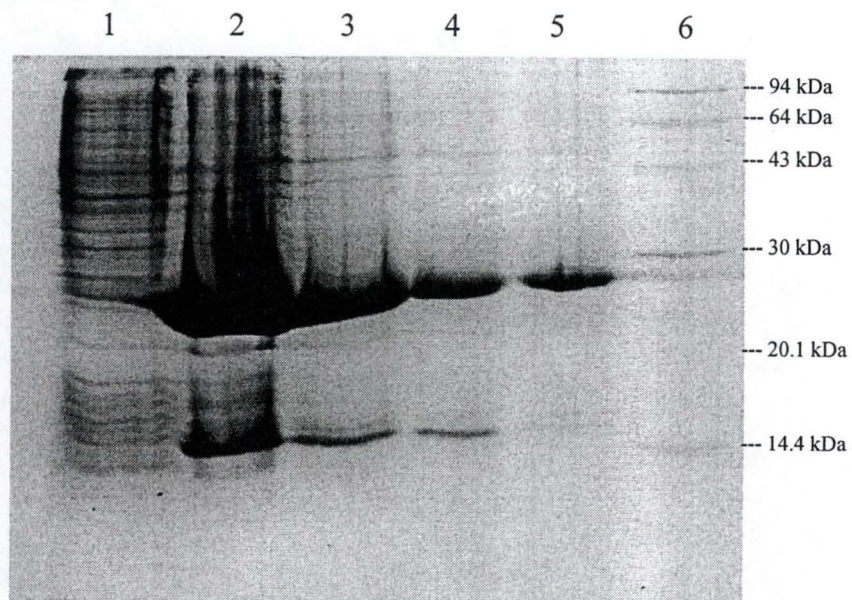


Figure 40 : Fraction insoluble d'un extrait protéique d'une culture, induite par IPTG, de BL-21 transformées avec le plasmide pET-15b contenant l'insert CREB540

Piste 1. Fraction insoluble d'une culture non induite
 Piste 2. Fraction insoluble d'une culture induite non diluée
 Piste 3. Fraction insoluble d'une culture induite diluée 2 X
 Piste 4. Fraction insoluble d'une culture induite diluée 50 X
 Piste 5. Fraction insoluble d'une culture induite diluée 100 X
 Piste 6. Marqueur de poids moléculaire Pharmacia Biotech

4. Expression des protéines CREB480 et CREB540

4.1. Induction à l'IPTG

La surexpression des inserts clonés dans le vecteur pET-15b est rendue possible par la présence de la T7 RNA polymérase dans les cellules BL-21 (DE3). En effet, celles-ci contiennent le gène codant pour la T7 RNA polymérase qui est sous la dépendance du promoteur lac UV5 qui est inductible par l'IPTG. L'ajout de ce dernier à une culture bactérienne induira donc la production en grande quantité de l'insert cloné (voir matériel et méthodes, point 2.1., *figure 18*)

L'induction de la surexpression de p480 et p540 commence par la mise en culture de bactéries BL-21 (DE3) transformées avec le vecteur pET-15b contenant soit l'insert CREB480 soit l'insert CRE540. Cette culture se déroule pendant 3 à 4 heures en milieu non inducteur. La culture bactérienne est ensuite induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Après une induction de 3 à 4 heures en présence d'IPTG, les bactéries sont récoltées et lysées. Les fractions protéiques solubles et insolubles sont récoltées, analysées par SDS-PAGE 15 % et colorées au bleu de Coomassie (*figures 37, 38, 39 et 40*). Les résultats obtenus sur les gels montrent, effectivement, une surexpression des protéines p480 (± 20 kDa^{*}) et p540 (± 22 kDa^{*}) après induction par l'IPTG. Une très grande majorité des protéines se retrouve dans la fraction insoluble de l'extrait protéique, c'est-à-dire certainement dans les corps d'inclusion. Une petite partie des protéines induites se retrouve également au niveau de la fraction soluble. On observe aussi que pour une induction dans des conditions identiques pour CREB480 et CREB540, la proportion en protéines p540 semble moins importante par rapport à la protéine p480 dans un extrait protéique. Les corps d'inclusion pouvant servir directement comme antigène, on utilise la fraction insoluble pour l'immunisation des lapins.

* Les poids moléculaires des protéines p480 et p540, dépourvues de peptide His-tag (1870 Da), sont de 18364 Da et 20490 Da respectivement.

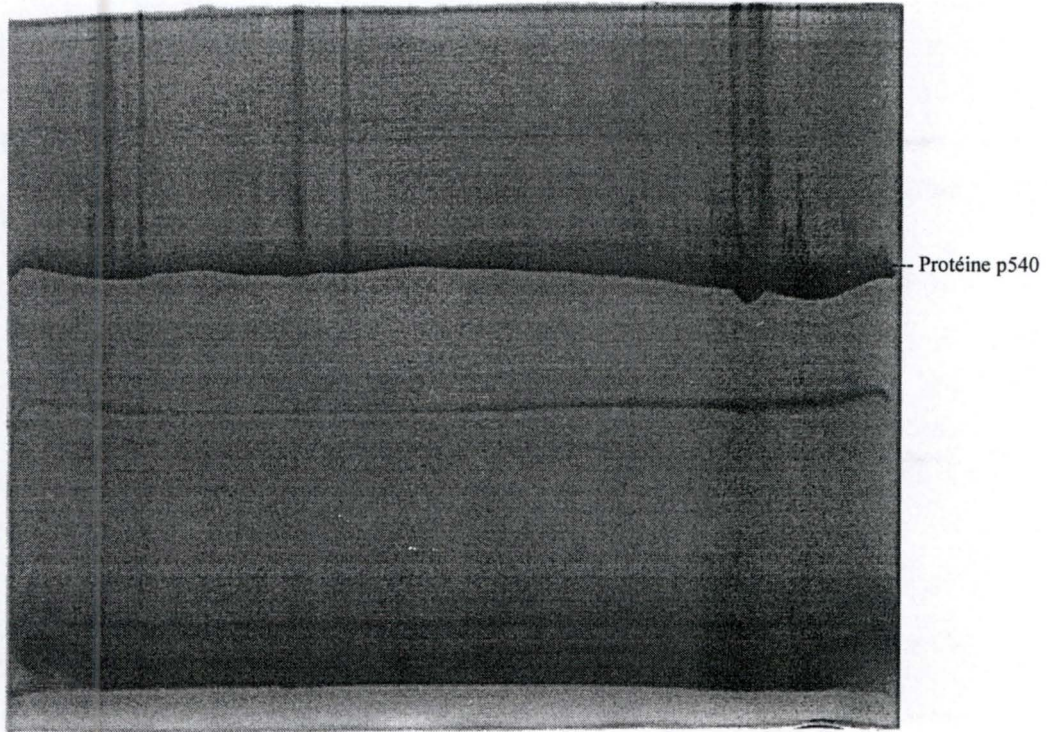


Figure 41 : Gel SDS-PAGE préparatif des corps insolubles contenant p540

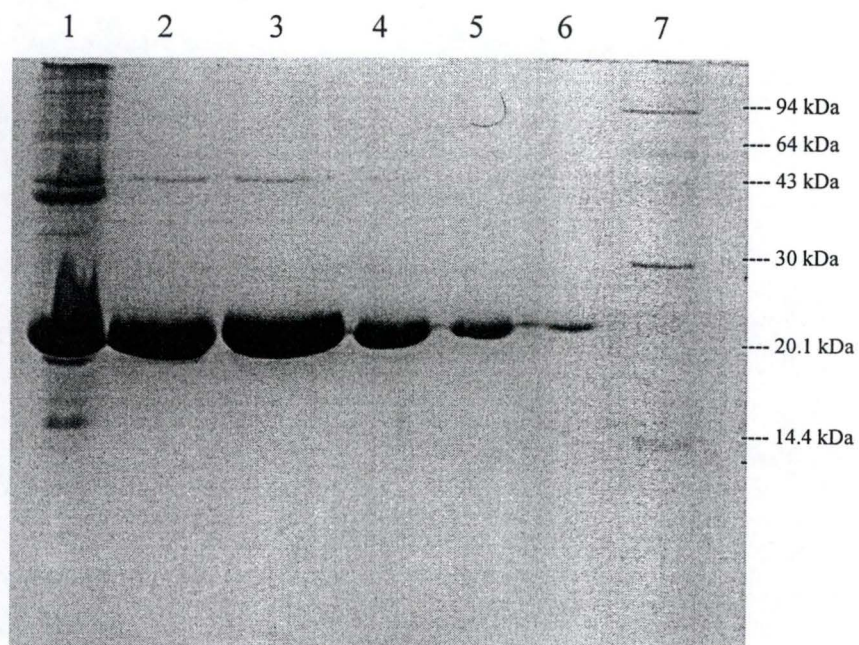


Figure 42 : Purification partielle de la protéine p480 par électro-élution

Piste 1. Fraction insoluble totale
 Pistes 2 et 3. Protéine p480 électro-élué non diluée
 Piste 4. Protéine p480 électro-élué diluée 2 X
 Piste 5. Protéine p480 électro-élué diluée 50 X
 Piste 6. Protéine p480 électro-élué diluée 100 X
 Piste 7. Marqueur de poids moléculaire Pharmacia Biotech

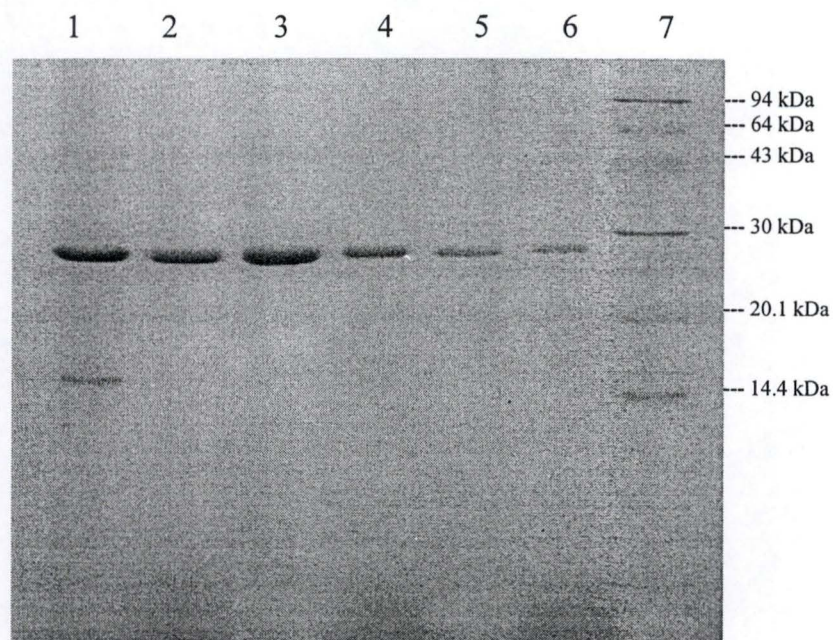


Figure 43 : Purification partielle de la protéine p540 par électro-élution

Piste 1. Fraction insoluble totale diluée 100 X
 Pistes 2 et 3. Protéine p540 électro-élué non diluée
 Piste 4. Protéine p540 électro-élué diluée 2 X
 Piste 5. Protéine p540 électro-élué diluée 50 X
 Piste 6. Protéine p540 électro-élué diluée 100 X
 Piste 7. Marqueur de poids moléculaire Pharmacia Biotech

4.2. Purification partielle des protéines p480 et p540, et électro-élution

La fraction insoluble p480 (ou p540) a été déposée sur un gel préparatif SDS-PAGE 15 % (*figure 41*). La bande correspondant à p480 (ou p540) a été découpée du gel et électro-éluée. Les protéines électro-éluées ont été analysées sur un gel SDS-PAGE 15 % et colorées au bleu de Coomassie (*figures 42 et 43*). Au niveau des deux gels, une bande de poids moléculaire supérieur apparaît (non visible sur la *figure 43*). Cette bande semble avoir le double du poids moléculaire des protéines d'intérêt. Les fragments p480 et p540 représentent le domaine leucine zipper de protéines b-ZIP végétales. Il est donc possible que ces bandes soient le résultat de la dimérisation de deux domaines leucine zipper de p480 ou de p540.

4.3. Immunisation des lapins

Les protéines électro-éluées ont été mélangées à l'adjuvant QuilA (V/V) et injectées à des lapins à raison de 1 ml de mélange par lapin. Des injections de rappel ont été réalisées toutes les deux semaines. Des échantillons de polysérum sont récoltés à chaque rappel et analysés en dot blot.

5. Analyse des polysérums par dot blot et western blot

5.1. Dot blot

Le dot blot permet une vérification rapide de la présence d'anticorps dirigés contre les protéines d'intérêts p480 et p540. Quatre tests différents doivent être effectués pour chacune des deux protéines p480 et p540. Le premier test se réalise avec le polysérum

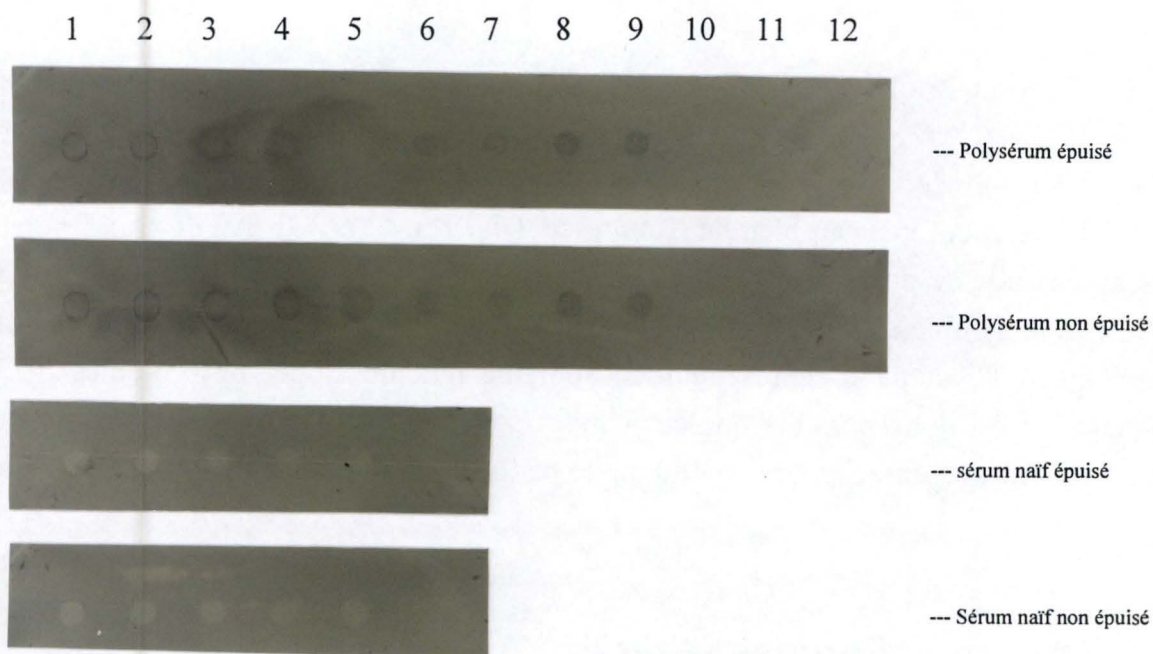


Figure 44 : Dot blot réalisé avec le polysérum dirigé contre la protéine p480

1. Fraction protéique insoluble brute contenant p540 (dilution 64X)
2. Fraction protéique insoluble brute contenant p540 (dilution 100X)
3. Fraction protéique insoluble brute contenant p480 (dilution 64X)
4. Fraction protéique insoluble brute contenant p480 (dilution 100X)
5. Protéines extraites de BL-21 (DE3) contenant pET-15b sans inserts et induites
6. Protéines p540 électroéluées (dilution 100X)
7. Protéines p540 électroéluées (dilution 200X)
8. Protéines p480 électroéluées (dilution 100X)
9. Protéines p480 électroéluées (dilution 200X)
10. Amylase
11. Poudre de lait
12. BSA

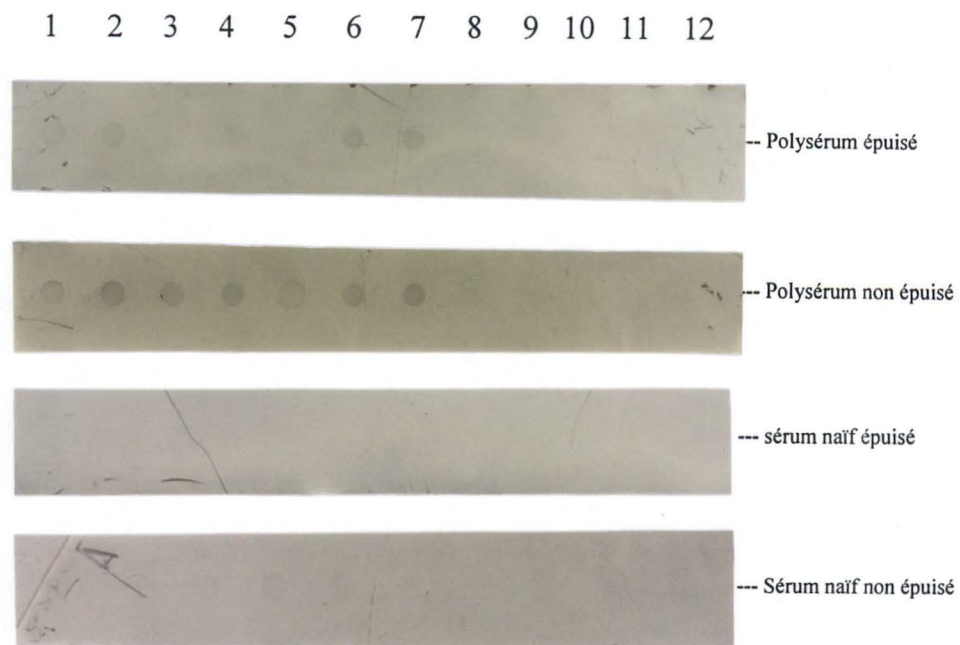


Figure 45 : Dot blot réalisé avec le polysérum dirigé contre la protéine p540

1. Fraction protéique insoluble brute contenant p540 (dilution 64X)
2. Fraction protéique insoluble brute contenant p540 (dilution 100X)
3. Fraction protéique insoluble brute contenant p480 (dilution 64X)
4. Fraction protéique insoluble brute contenant p480 (dilution 100X)
5. Protéines extraites de BL-21 (DE3) contenant pET-15b sans inserts et induites
6. Protéines p540 électroéluées (dilution 100X)
7. Protéines p540 électroéluées (dilution 200X)
8. Protéines p480 électroéluées (dilution 100X)
9. Protéines p480 électroéluées (dilution 200X)
10. Amylase
11. Poudre de lait
12. BSA

non épuisé, le second avec le polysérum épuisé, le troisième avec le sérum naïf non épuisé et le dernier test avec le sérum naïf épuisé.

L'épuisement du polysérum permet, d'une part d'éliminer les anticorps que le lapin aurait produits contre les protéines d'*E.coli* au cours de son existence (épuisement contre les protéines d'*E.coli*); et, d'autre part, d'éventuels anticorps que le lapin aurait produits contre la polyhistidine fusionnée avec les protéines d'intérêt (épuisement contre les protéines d'*E.coli* transformé avec pET-15b et induit).

Après avoir déposé les protéines au niveau de la membrane et après avoir saturé celle-ci une nuit avec une solution de Tween-20 0.1 %, on teste les polysérums. Les 2 polysérums ont été testés simultanément contre les 2 protéines d'intérêt afin de mettre en évidence une éventuelle reconnaissance croisée. La fixation non spécifique de l'anticorps secondaire a également été vérifiée (résultats non présentés). De plus, différents contrôles négatifs (amylase, poudre de lait et BSA) ont été introduits dans chacun des dot blot.

A la vue de ces dot blots (*figures 44 et 45*), on peut dire que les polysérums possèdent effectivement des anticorps contre la protéine contre laquelle ils sont dirigés (positions 1, 2, 6 et 7 pour le polysérum dirigé contre p540; positions 3, 4, 8 et 9 pour le polysérum dirigé contre p480). Les protéines électro-éluées, même diluées 200 X, sont reconnues par leurs polysérums respectifs (positions 6 et 7 pour le polysérum dirigé contre p540; positions 8 et 9 pour le polysérum dirigé contre p480). D'après les résultats obtenus, on peut également dire que les polysérums croisent (positions 3 et 4 pour le polysérum dirigé contre p540; positions 1, 2, 6 et 7 pour le polysérum dirigé contre p480). En effet, les protéines p480 et p540 constituent des fragments de deux protéines b-ZIP végétales (point 2.1. de ce chapitre), à savoir les domaines basique et leucine zipper de celles-ci. Il est donc concevable que des anticorps dirigés contre un de ces fragments ou domaines reconnaissent l'autre fragment ou domaine. En ce qui concerne les contrôles négatifs, les anticorps des deux polysérums n'ont pas reconnu ces protéines. Les sérums naïfs ne reconnaissant pas les protéines déposées, les lapins ne possédaient donc pas, avant injection, d'anticorps contre les protéines déposées sur la membrane de nitrocellulose.

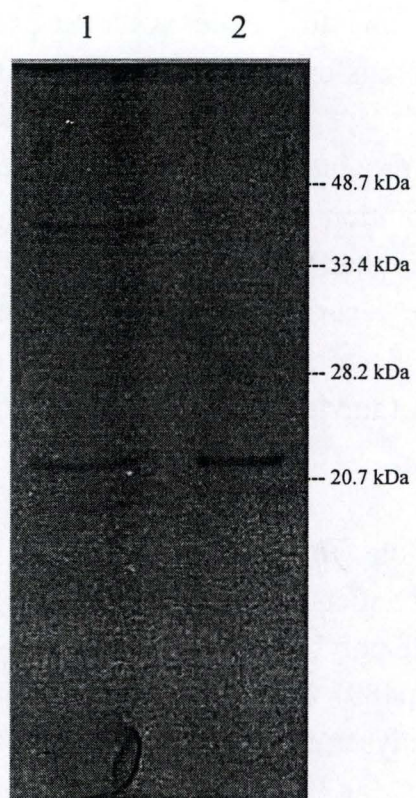


Figure 46 : Purification des protéines p480 sur résine His-Tag

Piste 1. Protéines purifiées sur la résine His-Tag
Piste 2. Protéine p480 électro-éluée

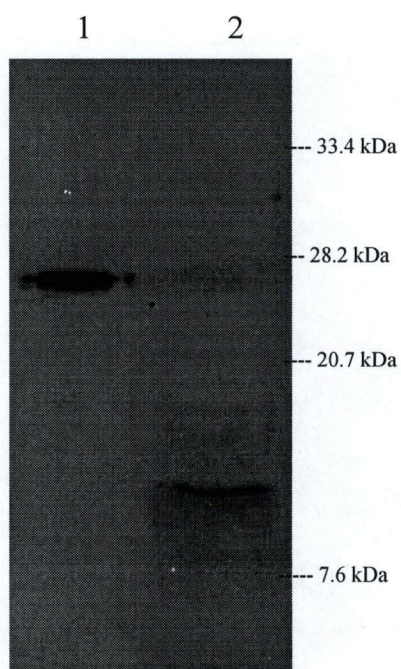


Figure 47 : Purification des protéines p540 sur résine His-Tag

Piste 1. Protéine p540 électro-éluée
Piste 2. Protéines purifiées sur la résine His-Tag

5.2. Purification de p480 et de p540 sur résine His-Tag

Les protéines p480 et p540 de la fraction soluble ont été purifiées sur une résine His-Tag qui permet, par affinité, de ne retenir que les protéines cibles en fusion avec une séquence polyhistidine. La polyhistidine se lie aux ions Ni^{2+} de la résine. Les protéines non fixées sont éliminées par plusieurs lavages, tandis que les protéines cibles sont éluées de la résine avec de l'imidazole.

Après passage sur la résine et élution, les protéines purifiées ont été analysées sur un gel SDS-PAGE 15 % et colorées à l'argent (*figures 46 et 47*). En premier lieu, on peut repérer une bande de taille comparable à la protéine électro-éluée, aussi bien au niveau du gel avec p480 qu'au niveau du gel avec p540. Cette bande représente la protéine purifiée contenant la polyhistidine. Cette bande apparaît très peu intense au niveau du gel concernant p540 et ce lors de toutes les purifications sur résine His-Tag de la protéine p540. Des bandes, autres que celles attendues au niveau des protéines éluées, apparaissent également sur les gels. Les bandes représentant des protéines de poids moléculaire plus faible que la protéine d'intérêt pourraient être des produits de dégradation causée par la purification. En ce qui concerne les bandes représentant des protéines de poids moléculaire plus élevé que la protéine d'intérêt, il pourrait s'agir de protéines ayant subi une dimérisation (entre les différents produits de dégradation ou avec la protéine non dégradée).

5.3. Digestion à la thrombine

Après leur purification sur la résine His-Tag, les protéines p480 et p540 ont été débarrassées de leur peptide "tag", à savoir la polyhistidine. L'enzyme utilisée pour enlever ce peptide "tag", dans le système pET-15b, est la thrombine. Le site de clivage spécifique de la thrombine (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) se trouve quelques acides aminés après la polyhistidine et en amont de la séquence d'intérêt des protéines p480 et p540.

Les protéines purifiées par la résine His-Tag ont été digérées avec différentes concentrations en thrombine comprises entre 0.0025 unité enzymatique et 1 unité enzymatique. Les digestions enzymatiques ont été effectuées à 37°C pendant 7 heures.

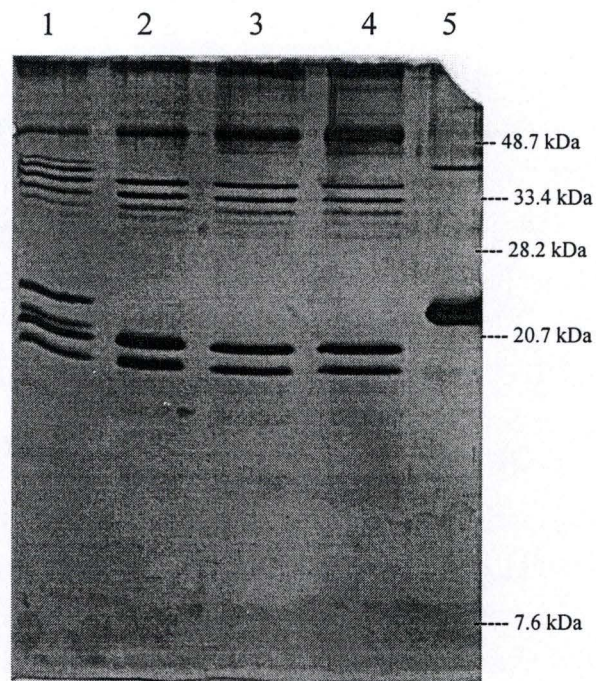


Figure 48 : Digestion par la thrombine des protéines p480 purifiées sur résine His-Tag

Pistes 1 et 2. Digestion avec 0.25 U de thrombine
Piste 3. Digestion avec 0.5 U de thrombine
Piste 4. Digestion avec 1 U de thrombine
Piste 5. Protéine p480 électro-éluée

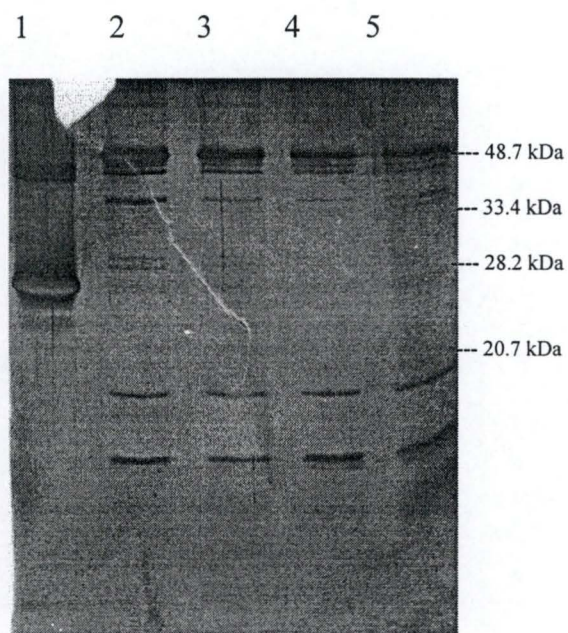


Figure 49 : Digestion par la thrombine des protéines p540 purifiées sur résine His-Tag

Piste 1. Protéine p540 électro-éluee
Piste 2. Digestion avec 1 U de thrombine
Piste 3. Digestion avec 0.5 U de thrombine
Pistes 4 et 5. Digestion avec 0.25 U de thrombine

Les protéines ont été analysées sur un gel SDS-PAGE 15 % et colorées à l'argent (*figures 48 et 49*). Les résultats obtenus après digestion montrent plusieurs bandes de poids moléculaires différents, au-dessus et en-dessous de la bande correspondant à la protéine éluée. Déjà, lors de purification sur résine His-Tag, on avait obtenu de telles bandes, et comme la fraction que l'on digère provient d'une purification préalable sur la résine, il est normal de retrouver ici aussi plusieurs bandes. Le nombre de ces bandes augmente par rapport à ce qui est observé lors de la purification. Quoique les protéines p480 et p540 ne possèdent pas de site de clivage pour la thrombine, la thrombine peut couper en dehors de son site de clivage dans certaines conditions. On comprend alors la présence de bandes de poids moléculaire inférieur à celui de la protéine éluée.

Les bandes de poids moléculaire supérieur correspondent certainement à des phénomènes de dimérisation entre les différents produits de dégradation ou avec la protéine d'intérêt. Différentes concentrations en thrombine ont été utilisées pour tenter de diminuer les hydrolyses non spécifiques. Malgré cela, les produits de dégradation apparaissaient toujours.

5.4. Western blot

Après avoir vérifié, par dot blot, la présence d'anticorps dirigés contre les protéines p480 et p540 dans les deux polysérums, la dernière étape de ce mémoire consiste à tester les polysérums par western blot d'abord sur les protéines de BL-21 (DE3) transformées puis sur les protéines de chicorée. Les résultats obtenus lors de ces westerns blot permettront de répondre aux questions posées lors des étapes précédentes du mémoire, à savoir la confirmation du phénomène de dimérisation des protéines p480 et p540, et la nature des bandes "parasites" présentes dans les fractions purifiées sur résine His-Tag puis digérées par la thrombine.

5.4.1. Western blot sur protéines d'*E.coli*

Les protéines insolubles des souches BL-21 (DE3) transformées avec CREB480 et CREB540 ont été solubilisées et déposées sur un gel SDS-PAGE 15 %. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et

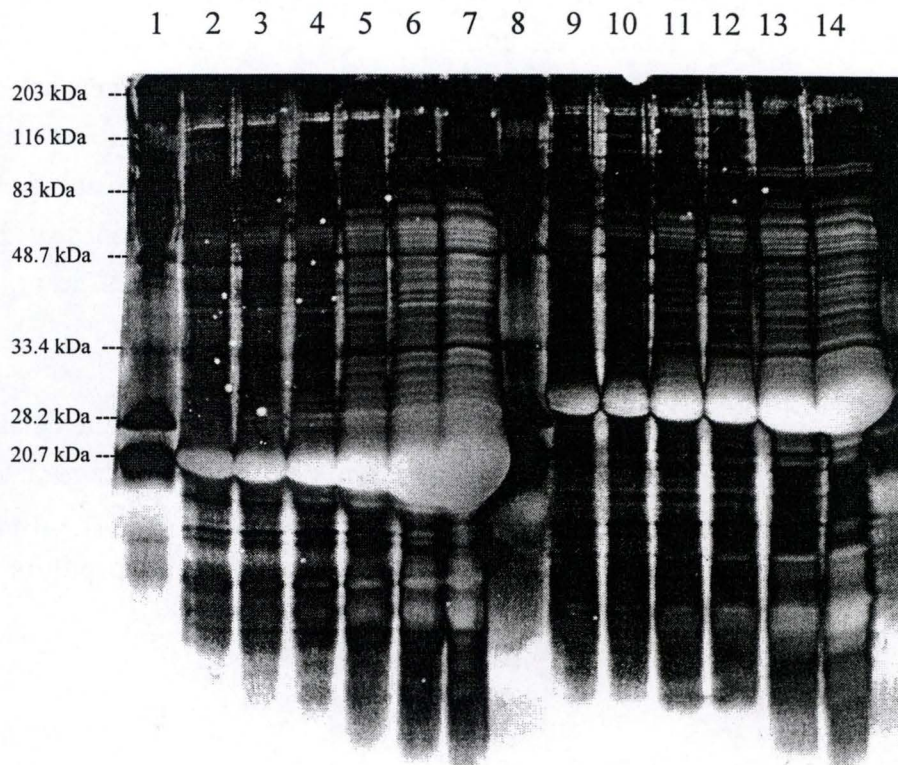


Figure 50 : Transfert de protéine depuis un gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose

- Piste 1. Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD
Piste 2. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480 induites, diluée 5 X
Piste 3. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480 induites, diluée 10 X
Piste 4. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480 induites, diluée 20 X
Piste 5. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480 induites, diluée 40 X
Piste 6. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480 induites, diluée 80 X
Piste 7. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480 induites, diluée 100 X
Piste 8. Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD
Piste 9. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540 induites, diluée 5 X
Piste 10. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540 induites, diluée 10 X
Piste 11. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540 induites, diluée 20 X
Piste 12. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540 induites, diluée 40 X
Piste 13. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540 induites, diluée 80 X
Piste 14. Fraction insoluble d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540 induites, diluée 100 X

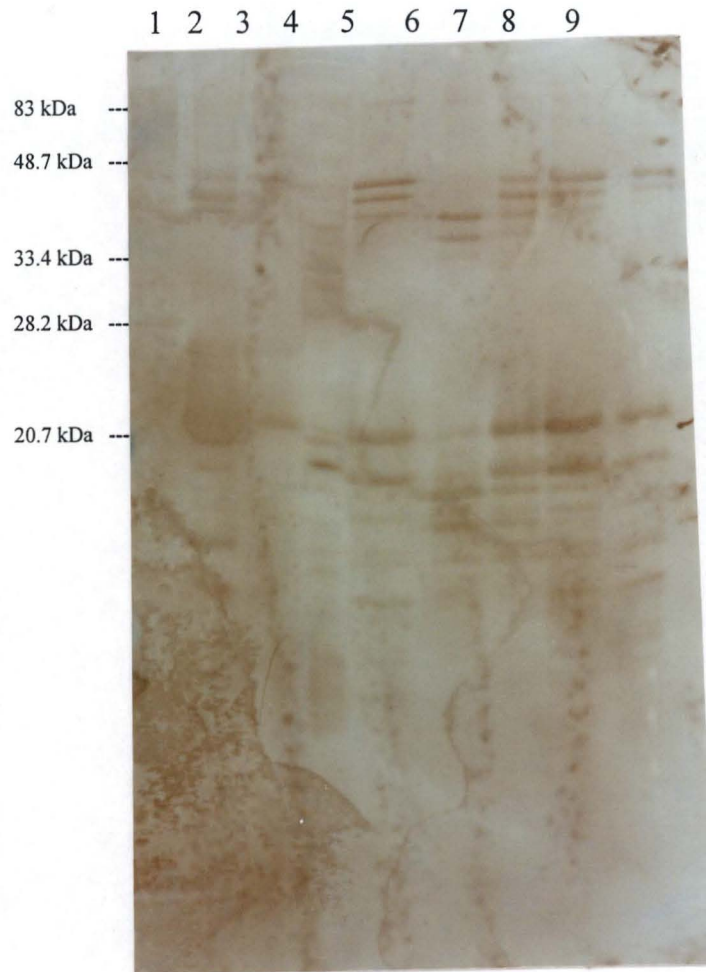


Figure 51 : Western blot contre les protéines totales d'*E. Coli*-CREB480 et contre les protéines p480 purifiées et digérées avec la thrombine

- Piste 1. P540 électro-éluée dilution 200 X
 Piste 2. Fraction insoluble totale d'une extraction à partir de colonies pET-CREB480
 Piste 3. p480 électro-éluée dilution 200 X
 Piste 4. Protéines d'*E. coli* transformé avec pET-15b sans insert et induit
 Piste 5. Protéines p480 purifiées non digérées
 Piste 6. Digestion avec 1 U de thrombine
 Piste 7. Digestion avec 0.5 U de thrombine
 Pistes 8 et 9. Digestion avec 0.25 U de thrombine

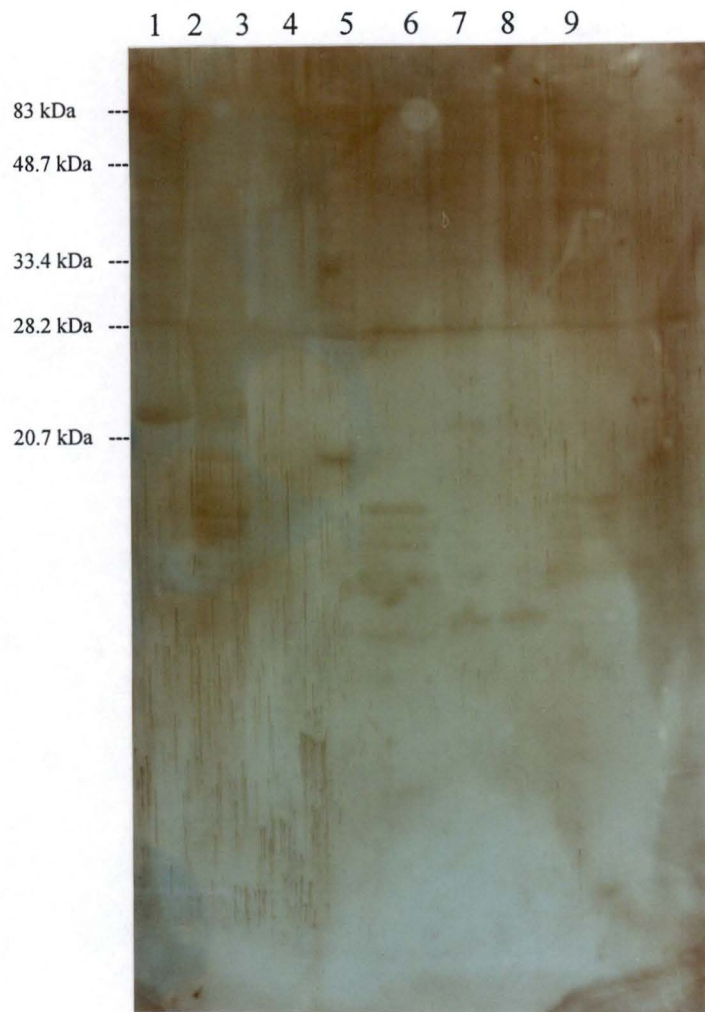


Figure 52 : Western blot contre les protéines totales d'*E. Coli*-CREB540 et contre les protéines p540 purifiées et digérées avec la thrombine

Piste 1. p480 électro-éluée dilution 200 X
 Piste 2. Fraction insoluble totale d'une extraction à partir de colonies pET-CREB540
 Piste 3. p540 électro-éluée dilution 200 X
 Piste 4. Protéines d'*E. coli* transformé avec pET-15b sans insert et induit
 Piste 5. Protéines p540 purifiées non digérées
 Piste 6. Digestion avec 1 U de thrombine
 Piste 7. Digestion avec 0.5 U de thrombine
 Pistes 8 et 9. Digestion avec 0.25 U de thrombine

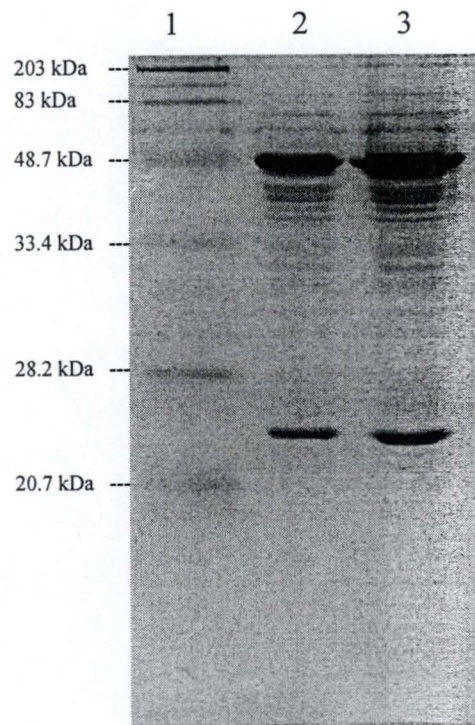


Figure 53 : Gel SDS-PAGE 15 % avec les protéines extraites à partir de feuilles de chicorée

Piste 1. Marque de taille BIO-RAD
Pistes 2 et 3. Protéines extraites de feuilles de chicorées

colorées au rouge Ponceau S (*figure 50*). Les membranes de nitrocellulose, après décoloration et saturation, ont été testées en présence des différents polysérums.

Rem : - Les membranes n'ont plus été testées en présence de polysérum naïf. Les dot blots montrant, en effet, l'absence d'anticorps croisant avec p480 et p540.

- La fixation non spécifique de l'anticorps secondaire a été vérifiée (résultats non présentés)

5.4.1.1. Western blot contre les protéines totales d'*E.coli*

En ce qui concerne le polysérum anti-p480 (*figure 51*), plusieurs bandes apparaissent au niveau de la fraction totale insoluble (piste 3). Une bande principale, de poids moléculaire identique à la protéine électroéluée est bien marquée. D'autres bandes, de poids moléculaires plus bas et certaines de poids moléculaires plus élevés, apparaissent également sur la membrane. Les bandes les plus basses correspondent probablement à des produits de dégradation de la protéine p480. Quant aux bandes de poids moléculaires plus élevés, il s'agit probablement de dimères formés par deux protéines b-ZIP p480 ou par les produits de dégradation. Le polysérum testé sur la protéine p540 éluée confirme le résultat obtenu lors des dot blots, à savoir que ce polysérum reconnaît également la protéine p540 et donc croise. Des résultats similaires ont été obtenus avec le polysérum dirigé contre p540 (*figure 52*).

5.4.1.2. Western blot contre les protéines purifiées et digérées avec la thrombine

Les différents polysérums ont été testés contre les protéines cibles purifiées sur résine His-Tag et digérées par la thrombine. Comme pour l'analyse SDS-PAGE de ces protéines (*figures 46, 47, 48 et 49*), le western blot révèle également plusieurs bandes protéiques (*figures 51 et 52*). La détection de protéines de poids moléculaire inférieur à p480 (ou p540) semble confirmer l'hypothèse de la dégradation ou de l'action non spécifique de la thrombine. La détection de protéines de poids moléculaire supérieur à



Figure 54 : Western blot contre les protéines de plante avec le polysérum dirigé contre p540

Piste 1. Protéine p540 électro-éluée
Piste 2. Protéines de racine de chicorée
Piste 3. Protéines de feuilles de chicorée

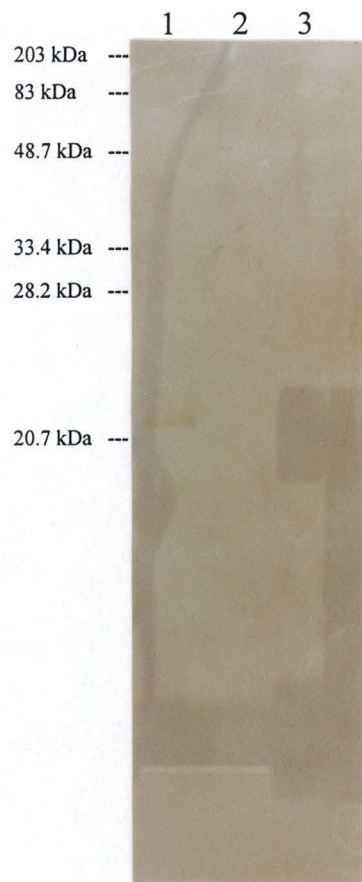


Figure 55 : Western blot contre les protéines de plante avec le polysérum dirigé contre p480

Piste 1. Protéine p480 électro-éluée
Piste 2. Protéines de racine de chicorée
Piste 3. Protéines de feuilles de chicorée

p480 (ou p540) semble, quant à elle, confirmer l'hypothèse de la dimérisation soit des protéines cibles, soit de leurs produits de dégradation.

La révélation de plusieurs bandes protéiques par les polysérums ne permet cependant pas de repérer la protéine cible dépourvue de son peptides "tag".

5.4.2. Western blot sur les protéines végétales

Les protéines végétales totales ont été extraites à partir de feuilles jeunes (*figure 53*) et de racines de chicorées. Les protéines extraites ont été déposées sur un grand gel SDS-PAGE 15 %. Après migration, les protéines ont été transférées à partir du gel sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert et la saturation de la membrane terminés, les différents polysérums ont été testés (*figures 54 et 55*).

En ce qui concerne le polysérum dirigé contre la protéine p540, celui-ci reconnaît deux protéines de poids moléculaire d'environ 50 kDa aussi bien dans les extraits protéiques de feuilles que de racines. Ces 2 protéines pourraient correspondre à des protéines CREB-like végétales natives qui, chez *Vicia faba* par exemple, possèdent un poids moléculaire de 47 kDa (genebank, accession number M81827)

En ce qui concerne le polysérum dirigé contre la protéine p480, aucune bande n'apparaît ni pour les protéines extraites des feuilles, ni pour les protéines extraites des racines.

Faute de temps, ces derniers western blots n'ont pu être réalisés qu'une seule fois. Il sera donc utile à l'avenir d'améliorer la détection du facteur de transcription CREB natif dont la concentration dans les cellules végétales est probablement très faible.

V. Conclusions générales et perspectives

1. Conclusions

Nous avons produit des sondes immunologiques contre les fragments de protéines b-ZIP végétales p480 et p540, ce qui était le principal objectif de ce mémoire. L'utilisation de ces anticorps, en pratique, nécessitera cependant encore quelques mises au point mineures.

Les tests par dot blots dans un premier temps, puis par western blots dans un second temps, ont démontré la présence d'anticorps dirigés contre p480 et p540 dans les polysérums récoltés chez les lapins immunisés. En effet, les différents échantillons analysés sur membrane (protéines électro-éluées, protéines purifiées sur résine His-Tag et protéines digérées à la thrombine) ont été reconnus par les anticorps présents dans les polysérums. Cependant, les polysérums n'ont pu être testés, faute de temps, qu'à une seule reprise sur les protéines végétales extraites des racines et des feuilles de chicorées industrielles. De plus, dans le cas du polysérum dirigé contre p480, aucune bande n'a pu être observée.

2. Perspectives

Plusieurs perspectives se présentent suite à ce travail :

- Les sondes immunologiques dirigées contre les fragments protéiques p480 et p540, pourront être utilisées dans l'étude de la phosphorylation de ces protéines b-ZIP, *in vitro* et *in vivo*, dans différentes conditions de stress telles que l'infection par un agent pathogène, l'impact d'agents polluants (métaux lourds, U.V.,...) ou les variations brutales des conditions climatiques. L'immunoprécipitation ou encore la détection conjointe de la phosphorylation par autoradiographie, et de la protéine CREB végétale avec les anticorps, permettront de savoir si le facteur est phosphorylé dans ces conditions de stress.
- Ces anticorps pourront également servir dans l'étude de la dimérisation de ces facteurs et dans l'étude de leur fixation au niveau des CREs sur l'ADN

par retard sur gel. De plus, ceux-ci permettront aussi l'étude de la spécificité de la reconnaissance entre les CREs et ces facteurs.

- D'autres facteurs protéiques interagissant avec ces protéines b-ZIP végétales, par exemple lors du lien effectué entre les facteurs de transcription et la machinerie basale de la transcription, pourront également être étudiés. Il faudra alors en premier lieu identifier les gènes complets codants pour les protéines b-ZIP chez la chicorée industrielle. Pour ce faire, les méthodes utilisées seront la 5' RACE et la 3' RACE PCR à partir de banques de cDNA. Une fois les gènes complets identifiés, la technique du double hybride permettra l'étude des interactions protéines-protéines.
- Enfin, la localisation du facteur CREB dans la cellule pourra être étudiée par l'utilisation de ces sondes immunologiques en immunocytochimie.

BIBLIOGRAPHIE

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

Armstrong D. L. and White R. E. (1992) An enzymatic mechanism for potassium channel stimulation through pertussis-toxin-sensitive G proteins. *Trends in Neurosciences* 15 (10) : 403-408.

Assmann S. M. (1995) Cyclic AMP as second messenger in higher plants. *Plant Physiol.* 108 : 885-889.

Barritt G. J. (1994) Communication within animal cells. *Oxford science publications, New-York* : 53-126.

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

Berridge M. (1985) Les molécules de la communication dans la cellule. *Pour la science* 86 : 134-146.

Bolwell G. P. (1995) Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *TIBS* 20 : 492-495.

Budde R. J. A. and Randall D. D. (1990) Protein kinase in higher plants. Inositol Metabolism in Plants. *Wiley-Liss.* 351-367.

Burgering B. M. T. and Bos J. L. (1995) Regulation of ras-mediated signalling : more than one way to skin a cat. *TIBS* 20 : 18-22.

Burgoyne R. D. (1992) Trimeric G proteins in golgi transport. *TIBS* 17 : 87-88.

Calos M. P. (1978) DNA sequence for a low-level promoter of the *lac* repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature* 274 : 762-765.

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

Causier B. E. and 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.

Choi E.-J., Xia Z., Villacres E. C., and Storm D. R. (1993) The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclase. *Current Opinion in Cell Biology* 5 : 269-273.

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

Clapham D. E. (1993) Mutations in G protein-linked receptors : novel insights on disease. *Cell* 75 : 1237-1239

Clapham D. E. (1996) The G-protein nanomachine. *Nature*, vol. 379 : 297-299.

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

Darnell J., Lodish H. et Baltimore D. (1988) La cellule, biologie moléculaire. *Vigot*.

De Jonge C. (1996) The cAMP-dependent kinase pathway and human sperm acrosomal exocytosis. *Frontiers in bioscience* 1 : 234-240.

Devalle J., Wang L., Gantz I., and Yamada T. (1992) Characterization of H₂ histamine receptor : linkage to both adenylate cyclase and [Ca²⁺]_i signaling systems. *American Physiological Society* : G967-G972.

Dolphin A. C. (1991) G protein modulation of calcium currents in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 52 : 243-255.

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

Gancedo J. M., Mazon M. J., and Eraso P. (1985) Biological roles of cAMP : similarities and differences between organisms. *TIBS* : 210-212

Garritsen A., Zhang Y., Firestone J. A., Browning M. D., and Cooper D. M. F. (1992) Inhibition of cyclic AMP accumulation in intact NCB-20 cells as a direct result of elevation of cytosolic Ca^{2+} . *J. Neurochem.*, vol.59, n°5 : 1630-1639.

Gill D. L. (1989) Receptor kinships revealed. *Nature*, vol. 342 : 16-18.

Gonzalez G. A., Yamamoto K. K., Fischer W. H., Karr D., Menzel P., Biggs III W., Vale W. W., and Montminy M. R. (1989) A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* vol. 337 : 749-752.

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

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

Haynes Jr J., Robinson J., Saunders, L. Taylor A. E., and Strada S. J. (1992) Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilatation. *American Physiological Society* : H511-H516.

Hirayama T. and Oka A. (1992) Novel protein kinase of *Arabidopsis thaliana* (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine and threonine. *Plant Molecular Biology* 20 : 653-662.

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

Housley M. D. and Milligan G. (1997) Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *TIBS* 22 : 217-224.

Iniguez-Lluhi J., Kleuss C., and Gilman A. G. (1993) The importance of G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Trends in cell biology* 3 : 230-324

Ishiguro S., Tanaka M., Kojimoto A., Kato M., Iwabuchi M., and Nakamura K. (1993) A nuclear factor that binds a dyad-symmetric sequence with a CGTCA motif in the 5'-upstream region of the sweet potato β -amylase gene. *Plant Cell Physiol.* 34(4) : 567-576.

Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M., and Satoh T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 60 : 349-400.

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

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

Lambright D. G., Sondek J., Bohm A., Skiba N. P., Hamm H. E., and Sigler P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379 : 311-319.

Lee K. A. W. (1991) Transcriptional regulation by cAMP. *Current Opinion in Cell Biology* 3 : 953-959.

Lefkowitz R. J. (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell, Vol. 74* : 409-412.

Li J., Lee Y.-R., and Assmann S. M. (1998) Guard cells posses a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol.* 116 : 785-795.

Li W., Luan S., Schreiber S. L., and Assmann S. M. (1994) Cyclic AMP stimulates K^+ channel activity in mesophyll cells of *Vicia Faba L.* *Plant Physiol.* 106 : 957-961.

Linder M. and Gilman A. (1998) Les protéines G, agents de liaison. *Pour la science, dossier les sociétés cellulaires*, 19 : 80-81.

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

McKnight G. S., Clegg C. H., Uhler M. D., Chrivia J. C., Cadd G. G., Correll L. A., and Otten A. D. (1988) Analysis of the cAMP-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. *Recent progress in hormone research* 44 : 307-335.

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

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

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

Nougarède A., Landré P., Rembur J., and Hernandez M. N. (1985) Des variations d'activité de la 5'-nucléotidase et de l'adénylate-cyclase sont-elles des composantes de la levée d'inhibition du bourgeon cotylédonaire du poids ? *Can. J. Bot.* 63 : 309-323.

Ohmori K., Hirose M. and Ohmori M. (1993) An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 34(1) : 169-171.

Pacini B., Petrigliano A., Diffley P., Paffetti A., Brown E. G., Martelli P., Trabalzini L., Bovalini L., Lusini P., and Newton R. P. (1993) Adenylyl cyclase activity in roots of *Pisum Sativum*. *Phytochemistry* 34 (4) : 899-903.

Palczewski K. and Benovic J. L. (1991) G-protein-coupled receptor kinases. *TIBS* 16 : 387-391.

Rasmussen H. (1989) Les ions calcium, messagers intracellulaires. *Pour la science* n°146 : 86-92.

Rawn J. D. (1990) Traité de biochimie. *De Boeck, Bruxelles.*

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

Spiegel A. M., Backlund Jr P. S., Butrynski J. E., Jones T. L. Z. , and Simonds W. F. (1991) The G protein connection : molecular basis of membrane association. *TIBS* 16 : 338-341.

Sternweis P. C. and Smrcka A. V. (1992) Regulation of phospholipase C by G proteins. *TIBS* 17 : 502-506.

Suzuki D. T., Griffiths A. J. F., Miller J. H., and Lewontin R. C. (1991) Introduction à l'analyse génétique. *De boeck, Bruxelles.*

Taylor S. S., Knighton D. R., Zheng J., Sowadski J. M., Gibbs C. S., and Zoller M. J. (1993) A template for the protein kinase family. *TIBS* 18 : 84-89.

Tezuka T., Hiratsuka S., and Takahashi S. Y. (1993) Promotion of growth of self-incompatible pollen tubes in Lily by cAMP. *Plant Cell Physiol.* 34(6) : 955-958.

Wadzinski, Wheat, Jaspers, Peruski, Lickteig, Johnson, and Klemm (1993) Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 2822-2834.

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

Wittinghofer A. and Pai E. F. (1991) The structure of Ras protein : model for a universam molecular switch. *TIBS* 16 : 382-386.