



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la transcription du gène de la pectine méthylestérase dans l'apex de *Sinapis Alba* (L.) lors de la transition florale.

Dauchot, Nicolas

Award date:
1999

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA TRANSCRIPTION DU GENE DE LA PECTINE
METHYLESTERASE DANS L'APEX DE *SINAPIS ALBA* (L.) LORS DE LA
TRANSITION FLORALE**

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

Nicolas DAUCHOT

Juin 1999

Etude de la transcription du gène de la pectine méthylestérase dans l'apex de *Sinapis alba* L. lors de la transition florale

DAUCHOT Nicolas

Résumé

Sinapis alba est une plante photopériodique qui fleurit en jours longs. Il est à présent admis que le stimulus floral, partant des feuilles vers le méristème, est de nature multifactorielle. Il comprend notamment divers régulateurs de croissance tels que les cytokinines ou la putrescine.

Un autre composant possible de ce stimulus multifactoriel pourrait être les oligogalacturonides, fragments issus de la dégradation des pectines des parois, connus pour leur capacité à stimuler la formation de fleurs sur des explants de tabac.

Il a été démontré chez *Sinapis* que les pectines des parois du méristème apical étaient largement dégradées très tôt au cours de la transition florale. Cette dégradation provoquant ainsi probablement la libération de fragments pectiques au niveau du méristème, mais également des modifications profondes de la paroi, pouvant jouer un rôle dans la différenciation cellulaire. Ces modifications des teneurs en pectines des parois résultent probablement de la libération d'enzymes pectolytiques, comme la pectine méthylestérase (PME), au niveau du méristème.

Ce mémoire a pour but, dans une première partie, la production d'une sonde ARN radioactive, dirigée contre une région très conservée des gènes de PME. Et dans une seconde partie, l'utilisation de cette sonde pour hybridation *in situ* sur coupes de méristèmes végétatifs et induits à fleurir. On constate notamment l'expression probable des messagers de PME au niveau des épidermes. Cependant, certains problèmes de reproductibilité ne permettent pas la comparaison des apex végétatifs et induits. Les mises au point de la technique, effectuées au cours de ce mémoire et à poursuivre sont discutées.

Remerciements

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier Messieurs les Professeurs **Van Cutsem** et **Messiaen**, du Département de Biotechnologie théorique des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'accueillant au sein de leur laboratoire.

La supervision du travail réalisé, tout au long de ce semestre, a été menée par **S. Sobry** de concert avec **L. Le**. Je les remercie tous les deux profondément pour les nombreux conseils prodigués et pour le temps qu'ils m'ont généreusement consacré.

Ce mémoire a été réalisé en collaboration avec le Service de Physiologie végétale de l'Université de Liège. Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur le Professeur **Bernier** ainsi qu'à Madame le Docteur **Jacqard** pour m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et m'avoir fourni la sonde contrôle. Je les remercie également de m'avoir permis d'utiliser leurs installations lors des prélèvements et de l'analyse des résultats.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à **N. Detry** pour m'avoir permis une première approche de l'HIS en septembre dernier et pour avoir répondu à mes nombreuses questions.

Je remercie également:

- Monsieur le Professeur **Goffinet** pour m'avoir permis la réalisation de nombreuses expériences dans son laboratoire

- Monsieur **R. Deom** du département d'Histologie de la Faculté de Médecine pour les conseils prodigués lors des travaux histologiques

- le Service de Culture expérimentale de l'Université de Liège pour la qualité des plantes fournies

- l'ensemble des membres du laboratoire pour l'accueil chaleureux qu'ils ont réservé aux mémorants de cette année ainsi que pour l'aide constante qu'ils m'ont apportée.

Merci aussi aux Professeurs **Vandehaute** et **Letesson** ainsi qu'au Docteur **Jacqard** et à **S. Sobry** pour leur participation au comité de lecture.

Je remercie, une fois encore, mon promoteur, Monsieur le Professeur **Van Cutsem** ainsi que mes deux directeurs de mémoire, **S. Sobry** et **L. Le**, pour la relecture du manuscrit et les remarques avisées apportées au cours des corrections.

Je voudrais, pour terminer, remercier mes parents ainsi que tous les membres de ma famille pour m'avoir encouragé tout au long de ces quatre années et pour avoir su conjuguer la vie de famille au rythme des contraintes de la vie d'étudiant.

Sommaire

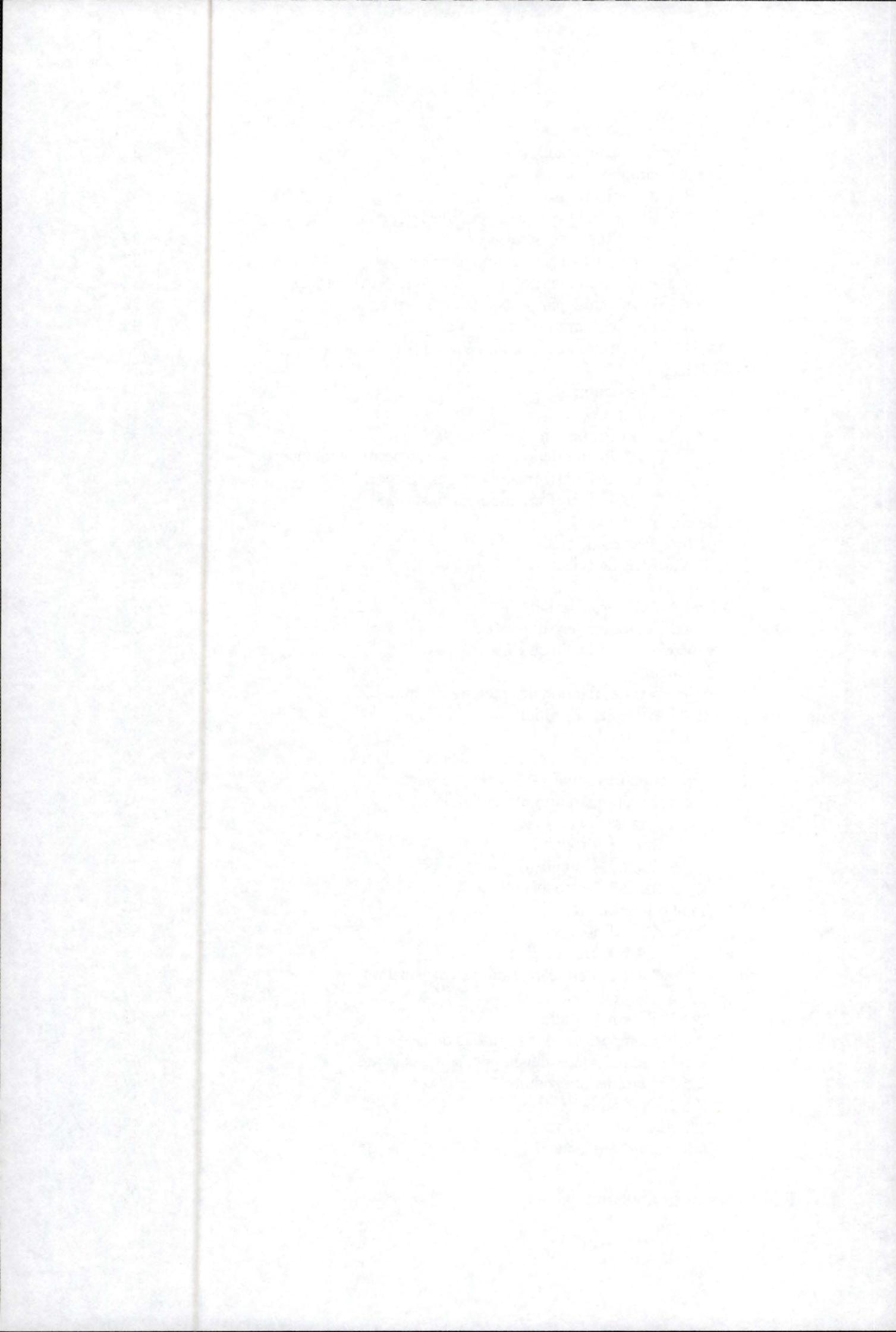
Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations

| | |
|---|-----------|
| 1. Introduction | 1 |
| 2. Relevé de la littérature | 6 |
| 1. Les contrôles de la floraison: aspects physiologiques et génétiques | 7 |
| 1. Introduction | 7 |
| 2. Physiologie de la transition florale | 8 |
| 2.1. Les carbohydrates | 9 |
| 2.2. Les cytokinines | 9 |
| 2.3. Les cations | 10 |
| 2.4. Les polyamines | 10 |
| 2.5. Les auxines | 11 |
| 2.6. La théorie du stimulus multifactoriel chez <i>Sinapis alba</i> | 11 |
| 3. Génétique de la transition florale: le cas <i>Arabidopsis thaliana</i> | 11 |
| 3.1. La voie de répression florale | 12 |
| 3.2. Voie d'activation de la floraison sensible à la photopériode | 13 |
| 3.3. Voie d'activation autonome | 15 |
| 3.4. La voie de promotion par la vernalisation | 15 |
| 3.5. Intégration des données physiologiques et génétiques | 16 |
| 2. Les oligosaccharides: rôles établis et modes d'action | 17 |
| 1. La paroi cellulaire | 17 |
| 2. Le rôle de messagers des oligosaccharides chez les plantes | 18 |
| 2.1. Rôle dans les réponses de défense | 19 |
| 2.2. Autres rôles des oligosaccharides | 20 |
| 3. Caractéristiques du signal pectique | 21 |
| 4. Transduction du signal pectique | 22 |
| 5. Les pectines chez <i>Sinapis alba</i> (L.) | 24 |
| 3. Les pectines méthylestérases | 26 |
| 3. Matériel et méthodes | 28 |
| 0. Matériel végétal et conditions de culture | 29 |
| 1. Clonage des sondes | 29 |
| 1.1. Extraction de l'ADN génomique de <i>Sinapis alba</i> | 29 |
| 1.1.1. Composition des solutions utilisées | 29 |
| 1.1.2. Matériel utilisé | 30 |
| 1.1.3. Protocole | 30 |
| 1.2. Electrophorèse sur gel d'agarose | 30 |
| 1.2.1. Marqueurs de taille | 31 |
| 1.2.2. Solution et tampon utilisés | 31 |
| 1.2.3. Matériel utilisé | 31 |

| | |
|---|----|
| 1.2.4. Protocole | 31 |
| 1.3. Polymerase chain reaction | 31 |
| 1.3.1. Composition | 31 |
| 1.3.2. Matériel utilisé | 32 |
| 1.3.3. Programme typiquement utilisé pour l'amplification d'ADN génomique de <i>Sinapis alba</i> | 32 |
| 1.4. Purification de fragments d'amplification | 32 |
| 1.4.1. Purification via colonnes Amicon Microcon 100 | 32 |
| 1.4.2. Purification par précipitation à l'éthanol | 32 |
| 1.4.3. Purification par extraction de gel | 32 |
| 1.4.4. Purification avec le Kit Wizard (Promega) | 33 |
| 1.5. Clonages | 34 |
| 1.5.1. Restriction | 34 |
| 1.5.2. Ligation | 34 |
| 1.5.3. Transformation | 35 |
| 1.5.3.1. Production de bactéries électrocompétentes | 35 |
| 1.5.3.2. Transformation par électroporation | 35 |
| 1.5.3.3. Transformation par heatshock | 36 |
| 1.6. Sélection | 36 |
| 1.6.1. Test blanc/bleu | 36 |
| 1.6.2. PCR de sélection | 37 |
| 1.7. Séquençage | 37 |
| 1.7.1. PCR préparative | 37 |
| 1.7.2. Réaction de séquençage | 38 |
| 1.8. Sous-clonage d'un clone existant | 38 |
| 2. Hybridation <i>in situ</i> | 39 |
| 2.1. Prélèvement et fixation des méristèmes apicaux | 39 |
| 2.1.1. Matériel et produits | 39 |
| 2.1.2. Protocole | 39 |
| 2.2. Préparation des lames et coupes des échantillons | 40 |
| 2.3. Préparation des sondes ARN ³⁵ S radioactives | 41 |
| 2.3.1. Minipréparation plasmidique | 41 |
| 2.3.2. Transcription <i>in vitro</i> | 42 |
| 2.3.2.1. Produits | 42 |
| 2.3.2.2. Composition | 42 |
| 2.3.2.3. Protocole | 42 |
| 2.4. Etape d'hybridation | 43 |
| 2.4.1. Préhybridation | 43 |
| 2.4.1.1. Déparaffinage | 44 |
| 2.4.1.2. Perméabilisation et hybridation | 44 |
| 2.4.2. Hybridation | 44 |
| 2.4.3. Post-hybridation | 45 |
| 2.4.4. Composition des solutions utilisées | 45 |
| 2.5. Pose de l'émulsion et développement des lames | 47 |
| 2.5.1. Matériel et produits | 47 |
| 2.5.2. Protocole | 47 |
| 2.6. Coloration des lames | 48 |
| 2.7. Observation des lames | 48 |



| | |
|---|----|
| 1. Clonage en vue de la production de sondes ARN ³⁵ S radioactives | 50 |
| 1.1. Résultats de l'extraction de DNA génomique de <i>Sinapis alba</i> (L.) | 50 |
| 1.2. Détermination des amorces | 51 |
| 1.3. Amplification sur DNA génomique de <i>Sinapis</i> | 52 |
| 1.4. Clonage des sondes | 53 |
| 1.4.1. Restriction des inserts et du vecteur | 54 |
| 1.4.2. Ligation | 55 |
| 1.4.3. Transformation | 55 |
| 1.4.3.1. Résultats qualitatifs | 56 |
| 1.4.3.2. Efficience de transformation | 56 |
| 1.4.4. Screening des colonies repiquées | 56 |
| 1.5. Séquençage des clones | 57 |
| 2. Synthèse des sondes ARN ³⁵ S radioactives | 59 |
| 2.1. Résultats des différentes transcriptions | 60 |
| 2.1.1. Transcription SaMADS D | 61 |
| 2.1.2. Transcription des sondes SaPME1-2, SaPME3 et SaPME4 | 62 |
| 3. Résultats des tests d'hybridation | 64 |
| 3.1. Test SaMADS D | 65 |
| 3.2. Test PME | 66 |
| 3.2.1. Résultats de premier test PME | 66 |
| 3.2.2. Résultats du second test PME | 67 |
| 4. Discussion | 67 |

Perspectives **69**

| | |
|---|-------------|
| Annexes | An.1 |
| L'Hybridation <i>in situ</i> | An.1 |
| 1. Introduction | An.1 |
| 2. Aspects techniques | An.1 |
| 2.1. Inclusion paraffine: fixation et section | An.1 |
| 2.2. Cryosection | An.2 |
| 2.3. Préparation de la sonde | An.2 |
| 2.4. Marquage des sondes | An.3 |
| 2.4.1. Marquage radioactif | An.3 |
| 2.4.1.1. Sondes radioactives | An.3 |
| 2.4.1.2. Détection du marquage | An.4 |
| 2.4.2. Marquage non radioactif | An.5 |
| 2.5. Prétraitements avant hybridation | An.5 |
| 2.6. Hybridation | An.6 |
| 2.7. Traitements post-hybridation | An.6 |
| 2.8. Les contrôles | An.6 |
| 3. Conclusions | An.7 |

I Introduction générale



Figure 1.1: Stade végétatif (Sinapis alba (L.)).



Figure 1.2: Stade reproducteur (Sinapis alba (L.)).

Introduction générale

La vie de la plante s'articule autour de deux grands axes. Pendant la première partie de sa vie, la plante grandit et produit des organes végétatifs (figure 1.1). Ensuite, sous l'influence de facteurs endogènes et exogènes, celle-ci passe au stade reproducteur afin de perpétuer l'espèce (figure 1.2). Ce passage s'accompagne de modifications morphologiques et physiologiques.

Chez beaucoup de plantes, le succès de la reproduction est assuré par une synchronisation de la floraison des différents individus d'une même espèce. Cette synchronisation fait intervenir des facteurs environnementaux: on constate que les éléments de l'environnement présentant des variations au cours des saisons sont généralement impliqués dans ce phénomène.

Parmi ces facteurs à fluctuation saisonnière, on retrouve très tôt le rôle de la photopériode puisqu'il a été établi dès 1920 par Garner et Allard (Thomas and Vince-Prue., 1997 in Levy, Y.Y., and Dean, C., 1998).

Chez la plante, le centre de perception de la lumière se situe au niveau des feuilles grâce à une série de photorécepteurs sensibles soit à la longueur du jour, soit à la qualité de la lumière (Poppe *et al.*, 1998). Il est cependant intéressant de constater que c'est plus la longueur de la nuit que celle du jour qui constitue le facteur déterminant.

Parmi les différents modèles qui ont été émis au cours du temps, un seul semble actuellement faire l'unanimité: il s'agit de la théorie du stimulus multifactoriel proposée par le professeur Bernier dès le début des années 1980. Alors que les précédents modèles proposaient un contrôle de la floraison basé soit sur des hormones universelles (florigène et antiflorigène), soit sur une variation des apports en nutriments, le modèle du stimulus multifactoriel introduit, quant à lui, une première approche de la complexité des phénomènes mis en jeu. Cette complexité sera par la suite confirmée par les études génétiques menées sur le sujet grâce aux nombreux mutants de la floraison présents chez *Arabidopsis thaliana*.

L'approche physiologique de la transition florale menée par le laboratoire du professeur Bernier s'est faite sur *Sinapis alba*, la moutarde blanche. Cette plante de jour long est maintenue à l'état végétatif par des cycles de 8 heures de lumière et de 16 heures de nuit. Au terme de deux mois de croissance végétative, elle pourra être induite à fleurir par l'application d'un seul jour long (JL de 16 à 22 heures) ou d'un jour court décalé (JCD, un jour de 8 heures appliqué plus tard dans la journée, ce qui a pour effet de réduire la nuit suivante, comme dans le cas d'un jour long) (Bernier, 1989). Une représentation schématique des JC, JL et JCD se trouve en figure 1.3.

Chez *Sinapis*, un des événements les plus précoces observés suite à l'induction, au point de vue morphologique, est une vague de divisions cellulaires qui se produit entre la 24 et la 28^{ième} heure après le début du traitement inducteur (Bernier 1988). Ce pic de mitose peut être conçu comme étant la résultante d'une série de modifications observées dès que la plante entre dans la période de photo-extension, c'est-à-dire la période se situant au-delà de la huitième heure de lumière.

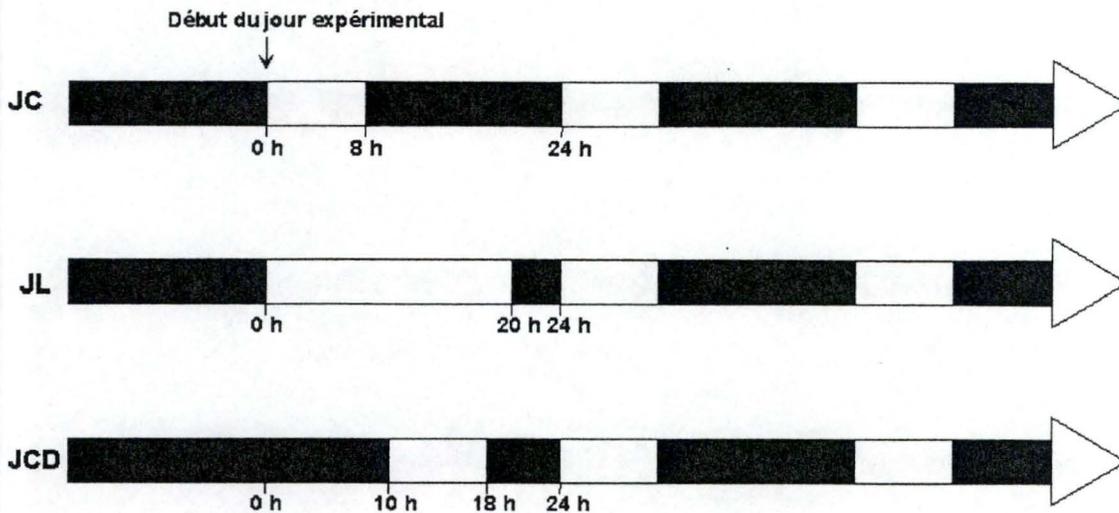


Figure 1.3: Schéma comparant la longueur d'un jour long (JL), jour court (JC), et jour court décalé (JCD). Les rectangles noirs représentent les périodes d'obscurité; les blancs, les périodes de lumière (aimablement fourni par S. Sobry).

La première de ces modifications, au point de vue physiologique, est une augmentation du saccharose exporté des feuilles vers l'apex et vers les racines dès la neuvième heure.

Suite à l'arrivée du saccharose au niveau des racines, on constate une exportation de cytokinines des racines vers les feuilles, puis des feuilles vers le bourgeon apical où elles arrivent vers la 16^{ème} heure. Ce moment correspond également à une arrivée de polyamines (putrescine), qui semblent coopérer avec les cytokinines dans les processus de divisions cellulaires (Dewitte, 1999).

Ces différents facteurs, ensemble ou pris séparément, sont insuffisants pour induire la floraison, ce qui milite en faveur de l'origine multifactorielle du stimulus floral. D'autres signaux sont encore à découvrir.

On peut ajouter aux différents éléments signalés plus haut une observation effectuée chez le tabac. En 1991, Victoria Marfà, du laboratoire de P. Albersheim, publiait un article dans « The plant journal » où elle décrit la formation de fleurs sur des explants de tabac après stimulation par une solution résultant de la dégradation partielle, par des endopolygalacturonases, de parois cellulaires de cellules de sycamore (Marfà *et al.*, 1991).

La purification de l'élément induisant la formation des fleurs sur les TCL de tabac (thin cell layer) a permis l'identification de polymères en α -1,4 d'oligogalacturonides ayant un degré de polymérisation de 12 à 14 (fragments pectiques). Les travaux de l'équipe d'Albersheim montraient donc pour la première fois que des fragments pectiques pouvaient également être impliqués dans un processus aussi complexe que la formation des fleurs. Tous ces éléments nous ont poussés à nous intéresser davantage aux pectines.

Pour comprendre l'importance cruciale que cette découverte laisse entrevoir, il faut la replacer dans son contexte: une des différences majeures entre les cellules animales et végétales est sans nul doute la présence d'une paroi cellulaire. On est loin actuellement de la conception selon laquelle cette structure particulière ne représentait qu'une boîte rigide. Elle est considérée actuellement comme une mosaïque complexe avec une multitude de formes et de fonctions (Carpita and Gibeau, 1993).

On distingue dans la paroi trois domaines indépendants: un domaine fondamental composé de cellulose et d'hémicelluloses (principalement des xyloglucanes chez les dicotylédonées) incorporées au sein d'un second domaine formé de polysaccharides pectiques et enfin, dernier domaine, les protéines structurales. Nous nous attarderons principalement sur la composante pectique de la paroi.

La découverte de Marfà vient allonger la liste des éléments démontrant les effets biologiques des fragments pectiques sur les cellules végétales. On trouvera ci-dessous quelques situations où ces fragments ont déjà montré clairement leur importance.

On peut citer l'effet de pathogènes des végétaux qui, sécrétant des enzymes pectolytiques, produisent des fragments pectiques. Ces fragments ainsi libérés interviennent dans différentes réponses de défense (Jin and West, 1984) menant notamment à la synthèse de phytoalexines (antibiotiques végétaux non protéiniques) lors de bioessais sur des cotylédons de soja (Nothnagel *et al.*, 1983).

Messiaen *et al.* (1993) ont démontré par imagerie de fluorescence que les oligogalacturonides ayant une niveau de polymérisation supérieur à 9 étaient capables de prendre leur conformation en egg box en présence de Ca^{++} et provoquaient une augmentation du calcium cytosolique dans des protoplastes de carotte. Le calcium étant un intermédiaire fréquent des voies de transduction du signal, on perçoit dès lors l'importance de l'étude des fragments pectiques.

En 1989, Liners *et al.*, ont réussi à produire un anticorps monoclonal dirigé contre les pectines présentant la conformation en egg box induite en présence de calcium. Cet anticorps, le 2F4, a par la suite été utilisé avec succès dans l'étude comparative des pectines dans des cals compacts et friables de betterave sucrière.

Ces anticorps ont également permis de faire une étude de la composition en pectine des méristèmes de *Sinapis alba* L. au cours de la transition florale. Ces travaux immunocytochimiques (S. Sobry, résultats non publiés) ont montré d'importantes modifications au niveau des pectines du méristème apical de *Sinapis* dans les premières heures après le début du traitement inducteur.

L'analyse statistique du marquage obtenu au niveau des zones de jonctions intercellulaires et des zones de parois entre ces jonctions a permis de mettre en évidence une importante diminution des teneurs en pectines. Cette diminution prendrait place très tôt, entre la douzième et la vingtième heure après le début du jour long.

Les pectines présentes au niveau du méristème de *S. alba* (L.) sont majoritairement sous forme estérifiée (méthylestérifiée ou acétylestérifiée). La diminution de la quantité de pectines totales provient, selon toute vraisemblance, de l'action de polygalacturonases, enzymes pectolytiques notamment impliquées dans les phénomènes de perte de structure consécutifs au mûrissement, comme démontré par Hadfield *et al.* (1998) dans leur étude sur le mûrissement du melon.

Cependant, ces enzymes hydrolytiques, impliqués dans la déstructuration des parois cellulaires, nécessitent l'action préalable d'enzymes catalysant la déstérification des pectines, comme les pectines méthylestérases (PME) ou les pectines acétylestérases (PAE).

Sous leur forme acide, les acides polygalacturoniques (pectines) sont alors sensibles à la dégradation par les polygalacturonases.

En sachant que la quantité de pectines présentes dans le méristème diminue au cours de la transition florale, que cette dégradation est dépendante des mécanismes de désésterification des pectines et que les pectines des méristèmes apicaux de *Sinapis* sont plus largement méthylestérifiées qu'acétylestérifiées, il nous est donc apparu capital d'essayer de mettre en évidence la présence de PME dans le méristème apical, ainsi que la variation probable de celles-ci après le traitement inducteur.

Cette dégradation, outre le fait qu'elle pourrait mener à la production de fragments pectiques pouvant jouer le rôle de messagers, permettrait l'indispensable coordination entre les différents territoires cellulaires au sein du méristème. On a en effet constaté que le développement des fleurs nécessitait un contact étroit entre les cellules, la formation de gradients de différentes protéines déterminant le devenir de chaque cellule (Haughn, 1999). Dans son rapport d'activité daté d'août 1997, S. Ormenese de l'Université de Liège, a montré un changement significatif du nombre de plasmodesmes à partir de la 32^{ème} heure après le début du jour long au sein et à l'interface de certaines couches bien délimitées du méristème de *Sinapis*. Ces plasmodesmes, par leur présence, permettent la formation d'un symplaste physiologique. Leur augmentation est donc hautement favorable à la mise en place de systèmes coordonnés. La modification des pectines dans les parois du méristème est peut-être un phénomène pouvant intervenir dans la formation de ces plasmodesmes.

Deux types de détection des PME peuvent être envisagés:

- au niveau transcriptionnel (m-RNA)
- au niveau traductionnel (protéine).

Les deux approches seront menées conjointement au sein de notre laboratoire. Nous nous chargerons de la détection au niveau de l'expression transcriptionnelle par hybridation *in situ* (HIS).

Outre l'intérêt que peuvent nous fournir les résultats quantitatifs, un autre intérêt de ces résultats concernera la localisation du marquage. Si on se rappelle les éléments évoqués plus haut se rapportant à l'augmentation du nombre de plasmodesmes, les informations concernant la localisation des PME pourraient apporter des données complémentaires très appréciables.

L'avantage de l'HIS par rapport à une technique telle que le Northern Blot est son extrême sensibilité. Elle permet en effet la détection de m-RNA contenu dans une seule cellule..

Enfin, alors qu'une quantité non négligeable de matériel est nécessaire à la réalisation d'un Northern Blot, et même si plusieurs hybridations consécutives peuvent être réalisées sur la même membrane, la même quantité de matériel permet de réaliser des dizaines d'HIS avec des sondes différentes (J. N. Wilcox 1993).

L'HIS peut être réalisée à partir de sondes c-DNA, m-RNA ou d'oligonucléotides synthétisés. Le marquage de ces sondes peut être réalisé via incorporation d'un nucléotide marqué radiocativement (³H, ³²P, ³³P, ³⁵S) ou non (biotine, digoxigénine). Après comparaison des différentes méthodes, les classement ci-dessous a pu être réalisé:

riboprobes > c-DNA > oligomère synthétique
 ^{35}S > ^{32}P > ^3H >> biotine/digoxigénine
échantillon gelé > paraffine

La technique de l'HIS est maintenant largement utilisée. De plus, l'obtention récente de résultats lors de tests d'hybridation avec des riboprobes ^{35}S dirigés contre des PME d'orange sur coupe de paraffine nous a fortement encouragés dans cette option (Christensen *et al.*, 1998). Nous réaliserons également les tests sur coupe paraffine avec des riboprobes ^{35}S . On retrouvera un aperçu des aspects techniques de l'hybridation *in situ* en annexe.

II Relevé de la littérature

1 Les contrôles de la floraison: aspects physiologiques et génétiques.

1. Introduction

Le plan général de la plante est établi pendant l'embryogenèse. Cependant, une grande partie du développement se produit après la phase embryonnaire. Dans la plupart des espèces, le méristème apical donne naissance à des organes végétatifs comme les feuilles, mais, suite à un stimulus, il accomplit la transition vers le développement reproducteur et la formation de fleurs. Ce changement est contrôlé par des signaux environnementaux et endogènes (Bernier, 1988).

Pour que la reproduction soit efficace, il faut que tous les individus d'une espèce fleurissent en même temps; c'est dans ce but que la majorité des plantes utilise des signaux environnementaux afin de réguler la transition florale. Tous les facteurs environnementaux qui subissent des variations saisonnières sont des éléments pouvant potentiellement jouer ce rôle de signal. On distingue la photopériode, la température, la disponibilité en eau ainsi qu'en nutriments et enfin les caractéristiques de la lumière (composition spectrale, quantité) (Y.Y. Levy and C. Dean, 1998).

Il a été observé que certaines plantes sont cependant moins sensibles aux variables environnementales que d'autres et que le déclenchement de la floraison se fait, chez ces espèces, principalement en réponse à des paramètres tels que leur taille ou le nombre d'entre-nœuds. La floraison peut également être induite par des stress comme une déficience en nutriments ou en eau. La fleur ainsi formée produira des graines qui seront plus susceptibles de perpétuer l'espèce en attendant le retour des conditions favorables (Y.Y. Levy and C. Dean, 1998).

Dans de nombreux cas, la floraison des plantes dépend des conditions photopériodiques. La durée des jours est perçue par les feuilles qui, en réponse, génèrent un stimulus floral. Celui-ci, transmis au méristème, y déclenche la mise à fleur. Malgré les nombreuses recherches qui lui sont consacrées, la nature du stimulus floral reste encore controversée.

L'analyse de la littérature concernant le sujet fait apparaître 3 modèles principaux qui se sont succédés au fil du temps pour tenter d'expliquer le contrôle de la transition florale:

- *l'hypothèse florigène / antiflorigène*

Le florigène, une substance promotrice de la floraison, est produit dans les feuilles sous des conditions photopériodiques favorables et est transporté dans le phloème jusqu'à l'apex. Une seconde hormone, inhibitrice, nommée antiflorigène, complète le signal de floraison. Cependant, après de longues et vaines recherches, ces deux hormones universelles restent toujours à découvrir.

- *l'hypothèse « nutrient diversion »*

Ici, l'induction florale, quelle que soit sa nature, est un moyen de modifier l'approvisionnement. L'induction provoque un meilleur approvisionnement de l'apex en nutriments, ce qui déclenche la suite des événements.



Figure 2.1.1: Sinapis alba (L.)

- hypothèse du contrôle multifactoriel

Dans ce dernier cas, le passage de l'état végétatif à l'état reproducteur est contrôlé par plusieurs substances chimiques, phytohormones et éléments assimilés. La nature de ces substances pourrait varier d'une espèce à l'autre. Chacune serait néanmoins requise à un certain moment et dans une certaine concentration pour que se réalisent les événements essentiels se déroulant lors de l'évocation florale. Cette dernière théorie est la plus largement admise actuellement.

Bien que ce mémoire traite de l'aspect physiologique du contrôle de la floraison, on fera également l'état des connaissances actuelles de la régulation génétique de la floraison.

Les physiologistes ont favorisé, pour leurs études, les plantes photopériodiques répondant à un seul cycle inducteur car ce sont les seules chez lesquelles on peut déterminer avec précision le temps zéro et où on observe une grande synchronisation entre les individus (Bernier, 1989). Dans le contexte de la floraison, c'est une *Brassicaceae*, *Sinapis alba* (L.) (la moutarde blanche) qui a été retenue (figure 2.1.1). D'autre part, pour les études génétiques chez les plantes, la taille réduite, le temps de génération court et le petit génome d'*Arabidopsis thaliana* en ont fait un modèle de choix.

Notre bref aperçu du contrôle génétique, bien qu'étant réalisé chez *Arabidopsis*, pourra être en grande partie extrapolé à *S. alba* (L.) car il s'agit de deux espèces très proches de la même famille (Bonhomme *et al.*, 1997).

2. Physiologie de la transition florale

Comme on l'a dit précédemment, le moment du passage de l'état végétatif à l'état floral est, chez la majorité des plantes, influencé par des facteurs internes et environnementaux. Les différents facteurs environnementaux sont perçus à des niveaux distincts:

- la photopériode est perçue par les feuilles matures
- la température est perçue par toute la plante bien que les basses températures soient principalement perçues par l'apex (vernalisation)
- la disponibilité en eau est évaluée via les racines.

Ces différents centres de perception sont localisés dans des parties géographiquement différentes de la plante. Pour avoir un effet, il faut que les différentes informations perçues interagissent. On en déduit dès lors que le devenir du méristème apical est contrôlé par un ensemble de signaux à longue distance provenant de toutes les parties de la plante (Bernier *et al.*, 1993).

Pour ce qui est des plantes sensibles à la photopériode, on considère les signaux comme étant généralement transportés des feuilles, organes de la perception de la lumière, vers le méristème apical via le phloème avec les assimilats. Les signaux provenant des racines sont transmis via le xylème par le flux de la transpiration.

Sinapis alba (L.) est une plante de jour long. A l'âge de deux mois, elle peut être induite à fleurir par exposition à un seul jour long (minimum 16 heures) ou à un jour court décalé.

La photopériode est perçue au niveau des feuilles matures et pas au niveau du méristème car celui-ci est non photosynthétique (Bernier, 1989). L'initiation du premier primordium floral par le méristème apical commence deux jours plus tard.

L'étude des modifications survenant dans la plante suite à l'induction se fait via des analyses comparatives des exsudats collectés dans les plantes induites et non induites. Les substances choisies, parmi les nombreux composés présents, le seront pour leur capacité à mimer certains des effets normalement observés au niveau du méristème apical lors de la transition florale. C'est pour cette raison que nous nous attacherons à étudier les carbohydrates, les cytokinines, les auxines, les polyamines et le calcium.

2.1. Les carbohydrates

Lorsqu'on expose *Sinapis alba* à une irradiance 2.5 fois supérieure à la normale, elle ne fleurit pas. Ce traitement cause cependant une augmentation du niveau de saccharose dans le méristème ainsi que certains des changements ultrastructuraux typiquement observés pendant la transition florale (Pryke and Bernier, 1978 repris de Bernier, 1993). Cette augmentation est pressentie comme étant due à l'augmentation de la photosynthèse, ce qui accroît la quantité des assimilats disponibles. Le saccharose est le sucre majeur des feuilles et des exsudats racinaires. On observe que son niveau augmente drastiquement dans les exsudats (aussi bien des plantes induites par un JL que par un JCD) très tôt après la transition. Cette augmentation du saccharose dans les exsudats se traduit par une accumulation également très précoce au niveau du méristème des plantes induites.

Le fait que l'on constate l'augmentation des teneurs en saccharose dans les exsudats après induction, et cela même si on n'augmente pas le taux de photosynthèse, laisserait penser que cet accroissement n'est pas consécutif à une biosynthèse accrue mais bien à une mobilisation des réserves déjà existantes, notamment au sein des racines et des feuilles.

Afin de confirmer ou d'infirmer cette théorie, on a fourni du ^{14}C aux plantes induites et on a regardé si le saccharose exporté était marqué ou non. Les résultats ont confirmé la théorie selon laquelle le saccharose mobilisé provenait de réserves (amidon) déjà présentes dans la plante (Bodson and Remacle, 1987 repris de Lejeune 1993).

Cette augmentation du saccharose est intéressante, car un des premiers changements observé après l'induction florale est un pic de mitoses 24 à 30 heures après le début du jour long, ainsi qu'un raccourcissement des phases du cycle (Y.Y. Levi *et al.*, 1998). L'accroissement des teneurs en saccharose dans le méristème précède donc l'activation de processus très consommateurs d'énergie. Cette augmentation du saccharose est donc à considérer comme une cause et non une conséquence du pic de mitose. Un rôle « *messagelike* » du saccharose est donc également envisageable.

2.2. Les cytokinines

Un autre traitement non inducteur mimant des phénomènes observés normalement lors de la transition florale est l'application d'une faible dose de cytokinines au bourgeon apical d'une plante cultivée en jour court. Un tel traitement permet en effet d'observer une synchronisation des divisions cellulaires (Havelange *et al* 1986).

Comme on le sait déjà, l'exposition au jour long provoque la production rapide d'un signal au niveau du centre de la perception de la lumière (les feuilles matures) qui est ensuite

transporté rapidement vers les racines via le phloème. La nature de ce signal, stimulant la production de cytokinines, est indéterminée, mais le saccharose est un candidat sérieux étant donné que son niveau augmente dès la première heure suivant l'extension de la photopériode (donc dès la neuvième heure).

Si on interrompt les échanges entre les racines et l'apex en découpant un anneau dans les couches supérieures de la tige, on constate que la floraison est inhibée si cette opération est réalisée à la huitième heure. Cette inhibition peut être levée par l'application de cytokinines sur le bourgeon apical à la 16^{ième} heure. En réponse à l'augmentation de saccharose en provenance des feuilles, il y a donc exportation de cytokinines des racines vers l'apex.

L'analyse des exsudats racinaires a montré que la cytokinine majeure qui s'y trouve est la zéatine riboside (ZR) et dans une moindre mesure l'isopentenyladenine riboside (iP). L'augmentation de ces composés est rapide et transitoire dans les exsudats racinaires en réponse au jour long (Bernier *et al.*, 1990 repris de Bernier 1993).

Cette augmentation semble aussi affecter les feuilles et l'apex dès la 16^{ième} heure après le début du jour long. Les cytokinines libérées par les feuilles sont sous forme d'isopentenyladenine. On ne sait cependant pas si ces cytokinines sont néosynthétisées dans les feuilles ou si elles dérivent de cytokinines d'origine racinaire étant donné que c'est là que se situe leur site majeur de biosynthèse. Les feuilles peuvent cependant être également un site additionnel de production en certaines circonstances.

2.3. Les cations

L'analyse des échanges de Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+ entre les différentes parties de la plante au cours de la transition florale chez *Sinapis alba* a permis de mettre en évidence une augmentation de ces trois cations dans les exsudats racinaires. On a aussi pu observer qu'aucun changement significatif ne se produisait dans les exportations au départ des feuilles, alors que seul le calcium augmentait significativement au niveau des exsudats apicaux aux environs de la trentième heure. Cette augmentation du calcium apical peut être mise en parallèle avec une stimulation des divisions cellulaires qui ont lieu à peu près au même moment. Cette vague de divisions cellulaires implique la formation de beaucoup de nouvelles parois cellulaires dont le calcium forme une composante importante. Les besoins causés par cette néosynthèse de parois causerait un effet « siphon » qui canaliserait le calcium des racines vers l'apex via le xylème (Havelange and Bernier 1993). Le calcium ne présente pas d'effet inducteur, il pourrait tout au plus jouer le rôle de messenger secondaire, notamment dans l'action des cytokinines.

2.4. Les polyamines

D'autres expériences, basées également sur l'étude des variations de la composition des exsudats, ont permis d'analyser les variations des teneurs en polyamines au cours de la transition florale.

Dans les différentes fractions récoltées chez *Sinapis*, les putrescines constituaient les polyamines les plus importantes. On constate que leur taux augmente rapidement et de façon marquée dans les exsudats foliaires suite à l'induction (entre la 9^{ième} et la 15^{ième} heure) et atteint un maximum général entre la 21^{ième} et la 27^{ième} heure. Le titre de putrescine dans les racines n'a, quant à lui, pas évolué.

Figure 2.1.2: Diagramme des boucles de régulations participant au contrôle de la transition florale chez Sinapis alba. Implication du saccharose et des cytokinines (Bernier et al., 1993).

Si on applique du DFMO (difluorométhylornithine), un inhibiteur irréversible de l'ornithine décarboxylase (enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'ornithine), à la huitième heure du jour long, alors on réduit fortement la concentration en putrescines libres et conjuguées dans les exsudats foliaires. On constate également une diminution importante de la réponse de floraison, cette diminution due au DFMO pouvant être annulée par une application simultanée de putrescine aux racines. Le DFMO diminue également les mitoses et la synthèse de DNA dans le meristème apical, phénomènes qui n'ont jamais pu être dissociés de la floraison (Havelange *et al.*, 1996).

Le rôle d'autres polyamines dans le contrôle de la transition florale est également apparu chez le tabac suite à l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de la spermidine et de la spermine. La spermidine s'accumule plus dans les bourgeons floraux que dans les bourgeons végétatifs. On a aussi observé que l'addition de spermidine dans un milieu de culture de tissus végétatifs pouvait induire leur floraison (Kaur-Sawhney *et al* 1988).

Il a été montré sur des cellules de carotte en suspension que la putrescine stabilisait la conformation en boîte à oeufs de fragments pectiques et augmentait, par là-même, le signal transduit par les cellules traitées. A l'inverse, la spermidine et la spermine déplaçaient le calcium des fragments pectiques et annulaient le signal (Messiaen and Van Cutsem, 1999).

En conclusion, on suppose que les polyamines coopèrent avec les cytokinines dans le processus de division cellulaire. Leur fonction exacte est encore inconnue.

2.5. Les auxines

La quantité d'auxine diminue fortement au niveau de l'apex dès la 16^{ième} heure après le début du stimulus. On observe donc une diminution du rapport auxine/cytokinine dans le bourgeon apical de la plante induite. Or un rapport aux/cyt faible est en général une des conditions nécessaires à la formation d'organes aériens (un rapport aux/cyt élevé étant favorable à la formation de racines).

2.6. La théorie du stimulus multifactoriel chez *Sinapis alba*

Ce modèle peut se présenter comme suit: en réponse à la perception d'un jour long (ou jour court décalé), a lieu une mobilisation des réserves d'amidon se trouvant dans les racines et dans les feuilles. S'ensuit une mobilisation de zéatine riboside et d'isopentenyladenine riboside racinaires qui remontent vers les feuilles dès la neuvième heure. Ensuite on observe une exportation d'isopentenyladenine riboside en provenance des feuilles qui atteint l'apex à la 16^{ième} heure en même temps que la putrescine, le tout menant au pic de mitose aux alentours de la trentième heure, à la mobilisation du calcium, ainsi qu'à de nombreux changements ultrastructuraux et moléculaires (figure 2.1.2).

3. Génétique de la transition florale: le cas *Arabidopsis thaliana*

Ce chapitre sur les régulations génétiques est largement inspiré des articles de synthèse publiés par Pidkowich *et al.*, (février 1999) et Levy *et al.*, (décembre 1998). On pourra y retrouver les références bibliographiques des différentes expériences réalisées ainsi que des conclusions qui en ont été tirées et qui ont permis de dresser le tableau présenté ci-après. La

Figure 2.1.3: Interactions entre les gènes appartenant aux différentes voies de contrôles génétiques de la floraison (Pidkowich et al., 1999).

figure 2.1.3 propose une synthèse des données concernant le contrôle génétique de la floraison.

Chez *Arabidopsis thaliana*, la formation de la fleur implique l'action séquentielle de 2 groupes de gènes:

- les gènes dits « d'identité florale du méristème » (floral meristem identity genes) qui vont faire évoluer le méristème de l'état végétatif à l'état floral. Cette catégorie de gènes comprend typiquement LFY, AP1, Cal, AP2 et UFO
- les gènes dits « d'identité des organes » (organ identity genes) qui vont diriger la formation des différentes parties de la fleur.

L'activation de ces gènes va s'opérer suite à l'action du produit de gènes contrôlant la période de floraison. La détermination du moment où la floraison va avoir lieu fait intervenir quatre voies de contrôles. Deux de ces voies sont dues à des facteurs endogènes et deux autres sont fonction

de l'environnement. Une de ces voies est répressive, les trois autres activatrices. Les deux voies de contrôle régulées par des facteurs endogènes sont typiquement:

- voie de répression florale:
cette voie permet l'inhibition de la floraison jusqu'à ce qu'une certaine taille ou un certain âge soit atteint par la plante
- voie activatrice autonome:
cette voie est supposée avoir un effet antagoniste croissant, au cours du temps, sur la voie de répression.

Les deux autres voies qui contrôlent les réactions face aux signaux ayant une origine environnementale sont:

- la voie de promotion photopériodique:
en font partie les gènes intervenant dans la réponse à la photopériode
- la voie de réponse à la vernalisation:
la vernalisation ne constitue pas un traitement inducteur, mais une étape d'exposition au froid est souvent nécessaire à la formation des fleurs.

3.1. La voie de répression florale

On distingue au sein de cette voie des gènes responsables de la répression indépendamment de la photopériode (EMF1, EMF2, ELF3 et PIF). D'autres gènes de répression de la floraison sont étroitement liés à la photopériode (ELF1, ELF2, PHY B, TFL1, TLF2, CLF, WLC).

L'étude des mutants, comme souvent en génétique, a permis de découvrir dans les gènes EMF un élément de contrôle négatif majeur de la floraison; en effet, les mutants *emf1* et *emf2* fleurissent sans presque montrer de phase végétative.

Une hypothèse a été avancée selon laquelle les produits des gènes EMF pourraient intervenir pour réprimer la floraison via leur interaction avec des gènes d'identité florale, comme AP1 et AG qui sont exprimés très tôt lors de la germination des graines *emf*. On a

également constaté que cette mutation *emf* pouvait être mimée par une expression constitutive de *LFY* (floral meristeme identity gene). De la même manière, certains produits de gènes favorisant la floraison pourraient agir en ayant une répression directe ou indirecte sur la fonction *EMF*.

Un autre gène intervenant dans la répression de la floraison est le gène *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*). En effet, comme chez beaucoup d'angiospermes, tous les méristèmes d'*Arabidopsis* ne développent pas de fleurs suite à l'évocation florale. Le méristème primaire et les méristèmes latéraux initiés sur les tiges latérales (deuxième ordre) maintiennent un programme végétatif pendant la phase reproductive: la plante est donc capable de déterminer le devenir végétatif ou inflorescentiel de ses méristèmes.

Chez les mutants *tfl1*, on observe la conversion de tous les méristèmes apicaux en méristèmes floraux au cours de l'évocation: *TFL1* est donc indispensable au maintien à l'état végétatif de ces méristèmes. On constate que l'expression basale localisée principalement dans l'apex avant la transition est augmentée dans les méristèmes qui vont garder un programme végétatif après l'induction. *TFL1* se pose comme un inhibiteur potentiel de la fonction de gènes tels que *FCA*, *FVE* et *FPA* (gènes faisant partie de la voie d'activation autonome) menant à l'activation de *LFY* et *AP1*. *TFL1* pourrait également interférer avec la capacité de *LFY* et *AP1* de s'activer l'un l'autre. Les facteurs qui influencent la plante dans le choix d'exprimer *TFL1* au niveau des méristèmes apicaux reste encore, à l'heure actuelle, à l'état de question.

CLF et *WLC* sont des gènes dont le produit retarde la floraison via interaction avec certains gènes d'identité du méristème; ils empêchent ces gènes de s'exprimer dans les tissus végétatifs, ce qui n'est plus le cas chez les mutants *clf* et *wlf* qui expriment alors *AG* (*AGAMOUS*) de façon ectopique dans les feuilles.

Un autre aspect de la répression, pourrait se situer au niveau d'une répression de la compétence du méristème à pouvoir répondre à des stimuli « flower promoting ». Les facteurs intervenant dans ce mode de régulation restent cependant encore mal définis.

Un dernier point, plus subtil, pourrait également jouer un rôle important dans la répression de la transition florale: le degré de méthylation du DNA. On a en effet constaté que l'hypométhylation, résultant de l'introduction d'un gène anti-sens, permet l'expression ectopique de *AG* et *AP3*, induisant par là-même un fleurissement précoce. On verra plus loin que le rôle de vernalisation peut probablement également se jouer à ce niveau là.

Pour avoir activation de la floraison, il faut donc que se développe soit une répression des inhibiteurs soit une activation de promoteurs de gènes intervenant dans le passage à l'état reproducteur, ou enfin un mélange des deux.

3.2. Voie d'activation de la floraison sensible à la photopériode

Comme on l'a déjà mentionné dans le chapitre consacré à l'aspect physiologique de la floraison, la transition florale trouve son origine, chez les plantes sensibles à la photopériode, au niveau des feuilles, les organes de perception de la lumière.

La plante détecte la lumière au moins dans 5 régions du spectre visible et utiliserait au moins trois classes de photorécepteurs. On peut distinguer:

- les cryptochromes qui détectent la lumière bleue et les ultraviolets A (UV- A)

- les phytochromes sensibles au rouge (R) et au rouge lointain (FR)
- des récepteurs encore non identifiés sensibles aux UV- B

On peut trouver cinq phytochromes chez *Arabidopsis thaliana* (PHY A à PHY E) et deux cryptochromes (CRY1 et CRY2).

Les nombreux travaux entrepris dès la mise en évidence de l'importance de la photopériode en 1920 par Allard et Garner, permettent maintenant de se faire une idée générale de la manière dont *Arabidopsis* perçoit et répond à la photopériode inductrice.

Ce schéma peut se concevoir comme ceci: tout débute par la perception d'un signal par les photorécepteurs (comme le phytochrome A ou CRY2). Le signal perçu est alors transmis à l'horloge circadienne. D'une manière ou d'une autre, la longueur du jour est mesurée et quand la longueur de la nuit descend sous un seuil limite, une première série de gènes favorisant la floraison seront activés. On ne parle pas encore à ce moment des gènes d'identité du méristème (LFY, AP1, Cal, AP2, UFO), ceux-ci seront régulés positivement plus tard par ces fameux gènes favorisant la floraison.

Comme on vient de le dire, d'une manière ou d'une autre, la longueur du jour et de la nuit est mesurée. On constate que ce qui est déterminant pour que la plante fleurisse, c'est beaucoup moins l'augmentation de la longueur du jour que la diminution de la longueur de la nuit. La qualité de la lumière affecte aussi la floraison: la lumière rouge l'inhibe (R) et le rouge lointain l'active. Le phytochrome B (PHY B) serait impliqué dans cette inhibition, mais pas au niveau de la perception de la longueur du jour. Le phytochrome A (PHY A) serait, lui, impliqué dans la perception de la longueur du jour et l'activation de la floraison par une photopériode inductive.

Chez *Arabidopsis*, on a observé que l'application de lumière bleue favorise la floraison. Quand on étudie le récepteur potentiel de cette lumière bleue (CRY2, produit du gène FHA) au moyen d'une plante transgénique surexprimant CRY2, on constate que la plante ainsi formée fleurit plus tôt que le WT (wild type). En aval, on constate une augmentation des m-RNA de CO (CONSTANS). Comme pour confirmer cette expérience, on constate que les transcripts de CO sont fortement régulés à la hausse pendant la transition florale. On a émis l'hypothèse que l'horloge circadienne a un effet sur l'expression des gènes en aval qui font partie de la voie de contrôle sensible à la photopériode, comme par exemple CO.

Une étude avec un système d'expression conditionnelle de CO (expression en présence de glucocorticoïdes), a montré que l'activité de CO était capable d'initier rapidement la transcription de LFY et d'induire la floraison. Si on produit une plante exprimant de manière constitutive LFY (via un promoteur constitutif 35S du CaMV), on constate qu'on réduit l'effet d'une mutation *co* chez la même plante: cette expérience semble confirmer l'hypothèse précédemment avancée.

Cependant, on pense que CO fait plus qu'activer LFY car les plantes exprimant ectopiquement CO fleurissent significativement plus tôt que celles exprimant ectopiquement LFY. Dès lors, l'hypothèse selon laquelle CO pourrait en plus agir comme une sonde biologique, qui permettrait de mesurer la longueur du jour, est une voie intéressante à explorer.

L'activation de AP1, autre gène d'identité du méristème floral, n'a lieu que plus tardivement par CO lors de tests en conditions photopériodiques inductrices; ce qui laisse

penser que CO est suffisant pour activer LFY mais qu'une voie complémentaire doit exister pour l'activation rapide de AP1.

Outre CO, d'autres gènes font apparaître chez la forme mutante un retard de la floraison en jour long alors que le phénotype en jour court reste identique. Ces gènes interviendraient dans la livraison d'un stimulus en réponse au jour long, celui-ci induisant la floraison. On retrouve donc, en plus de CO, GIGANTEA (GI), FT, FWA et FE. Il est probable que ces gènes agissent conjointement avec la voie autonome d'activation en activant les gènes d'identité florale du méristème, ainsi qu'en modulant la capacité de ce même méristème à répondre aux gènes FLIP (floral initiation process).

FWA, FT et FE, bien que faisant partie de la voie activatrice photopériode dépendante, diffèrent de CO dans leur mode d'activation des gènes FLIP. En effet, la construction 35S:LFY ne peut secourir le retard de floraison résultant d'une mutation ft, fwa ou fe. On sait que LFY est capable d'activer les autres gènes FLIP. FWA, FT, FE doivent jouer un rôle d'activation des FLIP mais indépendamment de LFY, probablement en activant Cal ou AP1.

3.3. Voie d'activation autonome

Contrairement aux gènes de la voie activatrice photopériodique, les gènes faisant partie de la voie autonome agissent indépendamment de la photopériode. On y place FVE, FPA et FCA. Bien que faisant partie de la voie autonome, ces gènes rappellent CO dans leur manière de réguler les FLIP. FVE et FPA sont impliqués dans l'activation de LFY et AP1.

Les phénotypes observés chez les mutants co, fve ou (fpa/fca) sont très semblables à lfy. De plus, le phénotype sauvage est restauré via 35S:LFY, ce qui laisse penser que ces gènes pourraient fonctionner de façon similaire ou redondante dans la promotion des FLIP.

3.4. La voie de promotion par la vernalisation

Chez de nombreuses espèces des régions tempérées, une étape préalable d'exposition au froid de la plante ou de ses graines est nécessaire pour qu'il puisse y avoir floraison.

On a constaté que la perception de la vernalisation était localisée au niveau de l'apex des pousses, bien que toute autre cellule se divisant activement puisse apparemment également percevoir la température.

La vernalisation ne constitue pas directement un processus d'évocation de la floraison mais prépare la plante à fleurir. La vernalisation semble faire sentir ses effets au niveau épigénétique puisque ses effets ne se transmettent pas d'une génération à l'autre.

Comme on l'a déjà évoqué dans la partie consacrée à la répression de la floraison, on pense qu'il pourrait s'agir d'une modification de la méthylation de l'ADN. Il s'agirait plus précisément d'une réduction de la méthylation des cytosines, suite à une possible activation de gènes intervenant dans la synthèse de l'acide kaurenolique hydroxylase. Cependant, le rôle de la méthylation dans la vernalisation n'est pas encore très clair.

3.5. Intégration des données physiologiques et génétiques

De telles interactions sont difficiles à établir; on peut cependant poser une hypothèse concernant le saccharose. Après un jour long, le saccharose dans les exsudats atteignant l'apex augmente rapidement et transitoirement. Cette augmentation précède le pic de mitoses qui prend normalement place dans le méristème consécutivement à l'induction.

On observe que le saccharose accélère la floraison des mutants *fve*, *fpa*, *fca*, *co* et *gi* alors qu'il reste sans effet sur les mutants *ft* ou *fwa*, ce qui indique qu'il n'accélère la floraison que via FVE, FPA, FCA, CO ou GI vu que son effet se fait sentir même s'ils sont absents ou non fonctionnels. Si par contre FT ou FWA sont absents, alors l'effet activateur du saccharose ne se fait plus sentir: on peut donc penser que l'activation de FT ou FWA nécessite le saccharose. Cette observation semble confirmer une des premières observations faites précédemment. On avait en effet placé FT et FWA au sein de la voie activatrice dépendante de la photopériode, cette même photopériode qui induit l'augmentation du saccharose.

Des mutants de l'amidon ont permis de confirmer l'hypothèse déjà évoquée selon laquelle le saccharose transporté vers l'apex à l'induction, provenait des réserves plus que de néosynthèse. On avait pressenti l'importance de l'amidon dans cette mobilisation et les études sur les mutants semblent aller également dans ce sens. On a utilisé dans ces études deux mutants: *pgm TC75*, un mutant sans amidon et le mutant *sop*, un mutant caractérisé par une surproduction d'amidon suite à une altération indéterminée dans la voie de dégradation.

Ces deux souches mutantes d'*Arabidopsis thaliana* ont une croissance et une floraison retardée quand cultivées en jour court, ce phénotype résultant dans les deux cas d'une incapacité à mobiliser l'amidon.

En ce qui concerne les gibbérellines, on constate que ces régulateurs de croissance végétaux ont des actions très variées d'une espèce à l'autre. On a montré que chez *Arabidopsis*, plante de jour long facultative, les GA subissaient des variations endogènes quand la plante était soumise à des stimuli inducteurs; chez certaines espèces, les gibbérellines peuvent même induire la floraison. On a par contre observé que l'application de ces mêmes GA à des plantes de jour court, c'est-à-dire fleurissant suite à une diminution de la photopériode, était rarement efficace pour induire la floraison et qu'elles pouvaient même aller jusqu'à inhiber la floraison chez les angiospermes ligneux (plantes ligneuses à fleurs). Pour ce qui est de *Sinapis*, les gibberellines n'ont montré aucun effet sur la floraison. Chez *Arabidopsis*, on pense qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'activation de l'expression de LFY.

L'étude des cytokinines par mutagenèse s'est avérée peu fructueuse, de par le faible nombre de mutants observé, ce qui indique qu'il doit y avoir un niveau de redondance élevé des gènes impliqués dans la régulation de leur taux physiologique.

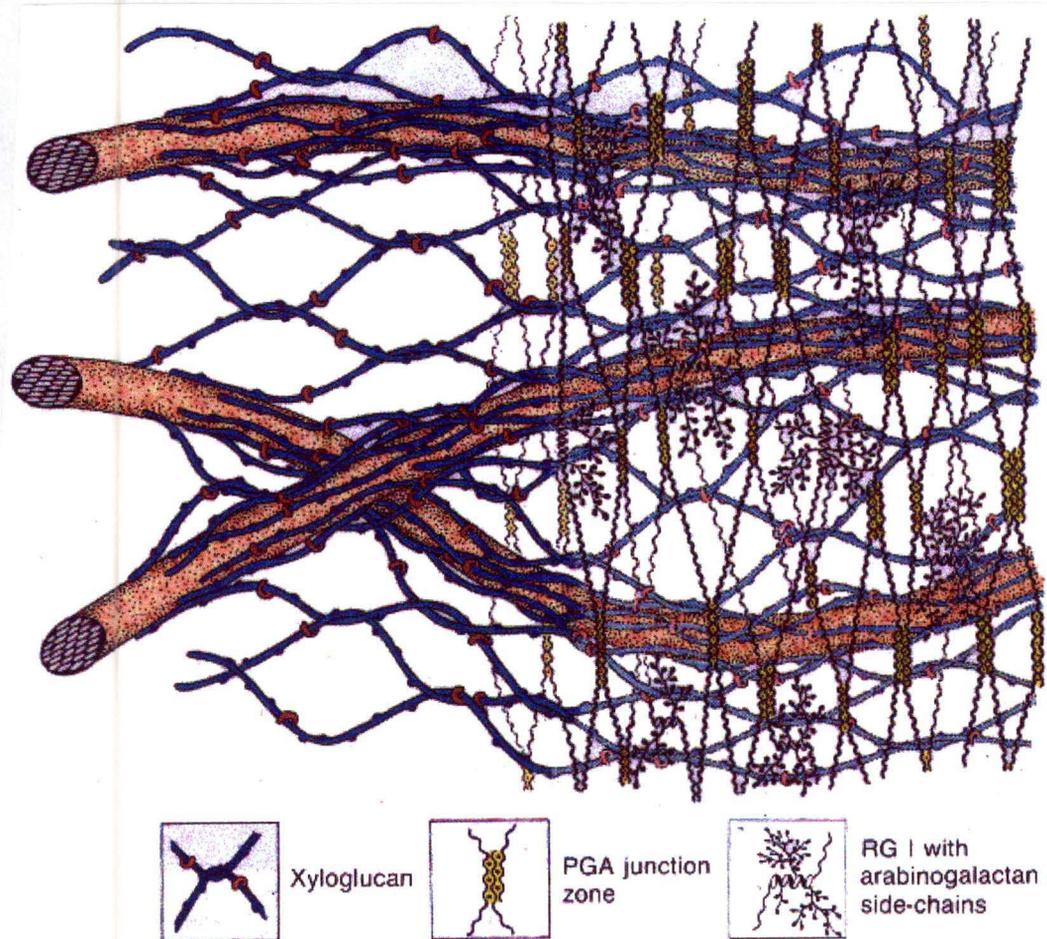


Figure 2.2.1: *Paroi cellulaire de la plupart des plantes à fleurs. Les trois grosses structures serpentiformes représentent des microfibrilles de cellulose (Carpita and Gibeau, 1993).*

2 Les oligosaccharides: rôles établis et modes d'actions

1. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire s'avère constituer, avec les chloroplastes, une des différences les plus visibles entre les cellules animales et végétales.

Une des premières fonctions reconnues de cette paroi semi-rigide est la résistance mécanique qu'elle confère à la plante. Cette structure, bien qu'imposante, ne présente qu'une faible barrière au passage des molécules, la sélectivité des échanges se passant principalement au niveau de la membrane plasmique sous-jacente (Albersheim and Darvill, 1985). Nous verrons plus tard que bien d'autres propriétés ont été découvertes par la suite à cette paroi et aux composés qui en font partie.

La paroi cellulaire est typiquement composée de 90% de polysaccharides et de 10% de protéines. Parmi les polysaccharides, on trouve les celluloses, hémicelluloses et pectines (figure 2.2.1).

La cellulose est structurée en microfibrilles d'un diamètre de 50 à 300 Å, représentant 20 à 30% du poids sec de la paroi pour un volume de 15%. Ces microfibrilles de cellulose résultent de l'association de monomères de glucose liés en β 1-4 (Varner and Lin 1989). L'orientation et le dépôt sont déterminés par les microtubules et sont généralement transversaux à l'axe de croissance.

On distingue parmi les végétaux des monocotylées et des dicotylées se différenciant par la présence de 1 ou 2 cotylédons à la germination. Les graminées font typiquement partie des monocotylées alors que *Sinapis alba* et *Arabidopsis thaliana* sont des dicotylées. Outre la différence d'aspect morphologique, des divergences au niveau de la composition de la paroi sont aussi présentes, notamment en ce qui concerne la composition en hémicelluloses.

En effet, alors que les xyloglucanes forment près de 20% du poids sec des parois primaires des dicotylées, ils composent seulement 2% des parois des monocotylées qui, elles, ont des xylanes comme hémicellulose majeur (Carpita and Gibeaut 1993). Les xyloglucanes sont composées d'une chaîne principale de D-glucose liés en β 1-4. On observe de plus la présence de chaînes latérales de xylose liés en O-6 sur le résidu glucose et certaines substitutions par des unités fucose, galactose et arabinose. La plupart des xyloglucanes sont liées étroitement aux microfibrilles de cellulose par des ponts hydrogènes (McNeil et al., 1984).

Enfin, les polysaccharides pectiques sont les composants les plus abondants de la matrice polysaccharidique de la paroi cellulaire de la plupart des plantes à fleurs (Jarvis, 1984). Ces polysaccharides sont subdivisés en 3 catégories:

- les homogalacturonanes: constitués d'acides galacturoniques liés en α 1-4 et rarement interrompus par des résidus rhamnoses (Jarvis, 1984). Les zones d'homogalacturonanes sont aussi appelées « régions lisses » car ne présentant pas de ramification.

- les rhamnogalacturonanes I: constitués d'une chaîne principale de rhamnose et d'acide galacturonique. On retrouve des résidus arabinoses, galactose, ou arabinogalactose liés sur les résidus rhamnose (Varner, 1989). Ces ramifications confèrent à ces régions l'appellation de « zones hérissées ».
- les rhamnogalacturonanes II: sont très différents des molécules précédemment citées. Ils contiennent des résidus glycosides rares comme le 2-O méthylfucose, 2-Ométhylxylose, 3-C-carboxy-5-déoxy-L-xylosyl et l'acide 3 déoxy-manno-octulosonique. Cependant, les rhamnogalacturonanes II sont en quantité trop faible pour constituer une composante structurale majeure; ils pourraient peut-être assumer d'autres rôles, comme par exemple celui de molécule signal (McNeil *et al.*, 1984).

2. Le rôle de messagers des oligosaccharides chez les plantes

Parmi les différentes molécules signal identifiées chez les plantes, on constate que les oligosaccharides se voient attribuer des rôles de plus en plus importants en intervenant dans des mécanismes aussi multiples que la régulation des systèmes de défense et de développement ou dans des événements comme le mûrissement (Promé and Demont, 1993).

On connaissait déjà 5 types de régulateurs chez les plantes: les auxines, les cytokinines, l'acide abscissique, l'éthylène et les gibbérellines. Ces substances ont toutes en commun leurs effets pléiotropiques. Les oligosaccharines (oligosaccharides à effet régulateur), quant à elles, possèdent une grande spécificité: chaque oligosaccharine semble commander une fonction particulière de la plante (Albersheim and Darvill, 1985).

Les oligosaccharines sont des fragments de polysaccharides découpés par des enzymes particulières dans les parois cellulaires: chaque enzyme libère un type d'oligosaccharine. L'action spécifique de ces sucres provient très probablement de la grande diversité de conformation rendue possible par l'utilisation d'unités saccharidiques comme monomères. En effet, la chimie des polysaccharides est une chimie incroyablement plus complexe que celle des protéines ou des acides nucléiques.... Alors que 2 acides aminés ou deux nucléotides ne peuvent s'associer que de deux façons différentes, il existe 64 types de liaisons différentes entre 2 molécules de sucre à 6 atomes de carbone et trois molécules de sucre peuvent s'assembler de plus de 1000 façons différentes (Albersheim and Darvill, 1985).

La nature polyanionique des pectines a fait penser que seul ce facteur intervenait dans l'effet activateur, mais l'utilisation d'autres polyanions (dextran sulfate, acide hyaluronique) n'ayant pas d'effet (Marfà *et al.*, 1991), on a été conduit à penser qu'une composante structurale devait aussi intervenir.

Les différents travaux consacrés aux rôles de pectines comme messagers ont montré que pour être efficaces, ces fragments devaient disposer d'un degré de polymérisation particulier (souvent supérieur à neuf et inférieur à 20) (John *et al.*, 1997). Il est possible qu'une explication pour cette dépendance vis-à-vis de la taille soit que seuls des fragments suffisamment grands puissent adopter la conformation reconnue par leur récepteur alors que les fragments trop grands, ne pourraient eux, plus atteindre ou se lier à leur récepteur (Marfà *et al.*, 1991).

2.1. Rôles dans les réponses de défense

Il est apparu que les réponses de défense face aux pathogènes, lorsqu'elles sont déclenchées par des oligosaccharines, peuvent avoir 2 origines: soit ces fragments proviennent des parois cellulaires de la plante soit ils proviennent des parois de l'envahisseur (Nothnagel *et al.*, 1983). La plante est donc capable de réagir à des substances étrangères mais également à ses propres constituants.

Ainsi, dans les stades précoces de pathogénèse, on observe que les microchampignons secrètent des enzymes de dégradation qui ont pour effet de dépolymériser la paroi cellulaire de la plante et de solubiliser les oligouronides (terme général définissant tous les acides uroniques: acides mannuroniques, guluroniques, galacturoniques...). Ces oligomères peuvent alors agir comme signaux pour initier les réponses de défense localisées. Parmi les ripostes induites par les oligouronides, on constate chez beaucoup de plantes la synthèse de glucanases et chitinases qui peuvent fragmenter la paroi cellulaire du champignon. Les oligomères relâchés peuvent à leur tour jouer le rôle de molécules signal et amplifier la réponse (Ryan and Farmer, 1991).

La régulation des défenses précédemment évoquées peut se faire via des PGIP (polygalacturonase inhibiting proteins), qui permettent de casser la spirale d'amplification pour retourner vers l'état initial. Ces protéines se retrouvent dans les parois d'un grand nombre de plantes (Ryan and Farmer, 1991).

Le rôle activateur des oligomères d'acide galacturonique a été démontré quand on a constaté qu'une digestion de pectines acides (désestérifiées) avec une polygalacturonase isolée d'un champignon (*Rhizopus stolonifer*) était capable de produire un mélange d'oligomères d' α -1,4 galacturonides. Ces fragments étaient alors capables d'activer la casbéne synthase chez *Ricinus communis* L. (castor bean). Le casbéne, un antifongique, était alors produit (Jin and West, 1983). Un minimum de DP de 9 unités est apparu être nécessaire à l'activité élicitrice. Celle-ci se maintenait jusqu'à une DP (degré de polymérisation) de 15 (Jin and West, 1983). Ils ont également montré que la mise en présence de pectine méthylée et de PG (polygalacturonases) ne produisait pas de fragments ayant un effet éliciteur, ce qui indique bien la nécessité d'une déméthylation préalable à l'action des PG.

Une expérience similaire a été menée suite à une hydrolyse acide de pectine de *Citrus*. On a observé que parmi les fragments obtenus, ceux composés de 12 monomères avaient la plus grande activité élicitrice menant à la production de phytoalexines (Nothnagel *et al.*, 1983). Les phytoalexines n'étant pas de nature protéique, on peut en conclure que les fragments mènent, dans ce cas, à l'activation d'une voie de synthèse plus qu'à la synthèse d'une seule protéine effective.

Une autre réponse à l'infection est la synthèse de lignine suite à l'addition de fragments pectiques. La synthèse de lignine en réponse aux oligouronides est aussi rapide que l'élicitation des phytoalexines qui trouvent toutes deux leur origine dans la voie des phénylpropanoïdes. On constate cependant qu'une certaine spécificité existe puisque ni les fragments pectiques, ni les heptaglycosides de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* n'induisent la lignification dans la feuille de blé. Un β -glucane de *Poria cocos* (champignon) était, quant à lui, capable de déclencher cette synthèse. (Ryan and Farmer, 1991).

Les phénomènes d'hypersensibilité et de nécrose sont également des réactions de défense qui peuvent être déclenchées par des oligosaccharides (Ryan and Farmer, 1991).

Quand on analyse la courbe dose-réponse des fragments les plus actifs lors d'une infection par un pathogène, on constate que celle-ci est typiquement non linéaire quand on stimule avec une dose croissante de fragments (Nothnagel *et al*, 1983). Ce type de courbe semble refléter la cinétique d'une cascade d'activation où le signal est amplifié pour atteindre rapidement un plateau, au moment où les cibles sont à saturation. Les concentrations activatrices dans ces réponses de défenses sont d'environ 10^{-7} à 10^{-9} M.

2.2. Autres rôles des oligosaccharines

Parmi les autres réponses déclenchées par les oligogalacturonides, on observe la production d'éthylène pendant le mûrissement, l'inhibition de l'action des auxines dans l'élongation de segments de tiges de pois (via les xyloglucanes) et l'induction de la morphogénèse dans les TCL d'explants de tabac.

En ce qui concerne le mûrissement, les fragments pectiques ont été mis en évidence comme étant capables de déclencher la synthèse d'éthylène sur des cultures en suspension de poire (Campbell and Labavitch, 1991). Les PG (polygalacturonases, enzymes de dégradations) et les fragments pectiques ont également été proposés comme régulateurs possibles de la synthèse d'éthylène chez la tomate où cette production est essentielle au mûrissement du fruit (Baldwin and Pressey, 1988). Dans ce cas, quand on infiltrait des PG + PME (pectine méthylestérases) dans une tomate-cerise verte, on augmentait de plusieurs fois la production d'éthylène par rapport aux fruits témoins traités avec les enzymes dénaturées. Quand on infiltrait un fruit non mûr avec des fragments de pectines isolés de fruits mûrs, on observait une accélération de la production d'éthylène et le mûrissement à la seule condition que le DP des fragments soit supérieur à 8 (Baldwin and Pressey 1988).

Alors qu'on connaissait déjà la capacité de l'auxine de stimuler la croissance des segments de pois, l'équipe d'Albersheim a cherché à savoir si des oligosaccharides provenant de paroi d'érable pouvaient modifier l'action de l'auxine sur les tiges. Les résultats ont montré que les polysaccharides extraits des parois des cellules d'érables sycomores inhibent, *in vitro*, la stimulation par l'auxine de la croissance du pois. Après isolement, on a déterminé que c'étaient des xyloglucanes qui possédaient l'effet inhibiteur. La concentration en oligosaccharines nécessaires à l'inhibition était environ 100 fois inférieure à celle d'auxine nécessaire à la stimulation de la croissance. Ce système d'inhibition est présent naturellement, en effet, l'auxine stimule la croissance de la tige du pois, mais active également une enzyme, qui, par son action sur les xyloglucanes, va libérer un nonasaccharide qui inhibe la croissance induite par les auxines (Albersheim and Darvill, 1985).

L'effet des oligogalacturonides sur la formation d'organes particuliers sur des tissus en culture a été testé. Les fragments pectiques ont été générés par clivage de parois cellulaires de sycomores par des endopolygalacturonases.

L'application de ces oligosaccharides a notamment induit la formation de fleurs sur des couches minces de pédoncule floral de tabac. Afin de confirmer l'origine pectique du signal, diverses expériences ont été menées. On a cherché à faire disparaître le signal via traitement à la chaleur ou via des protéases, mais le signal était toujours présent. La désestérification des pectines présentes n'influçait pas non plus l'effet organogénique. Par contre, si on procédait à un traitement supplémentaire avec des PG (polygalacturonases), suite à la désestérification, l'effet disparaissait. Des purifications ultérieures ont montré que dans ce cas, il s'agissait d'un oligogalacturonide d'un DP de 12 à 14. Une taille inférieure à 9 ou supérieure à 16 était

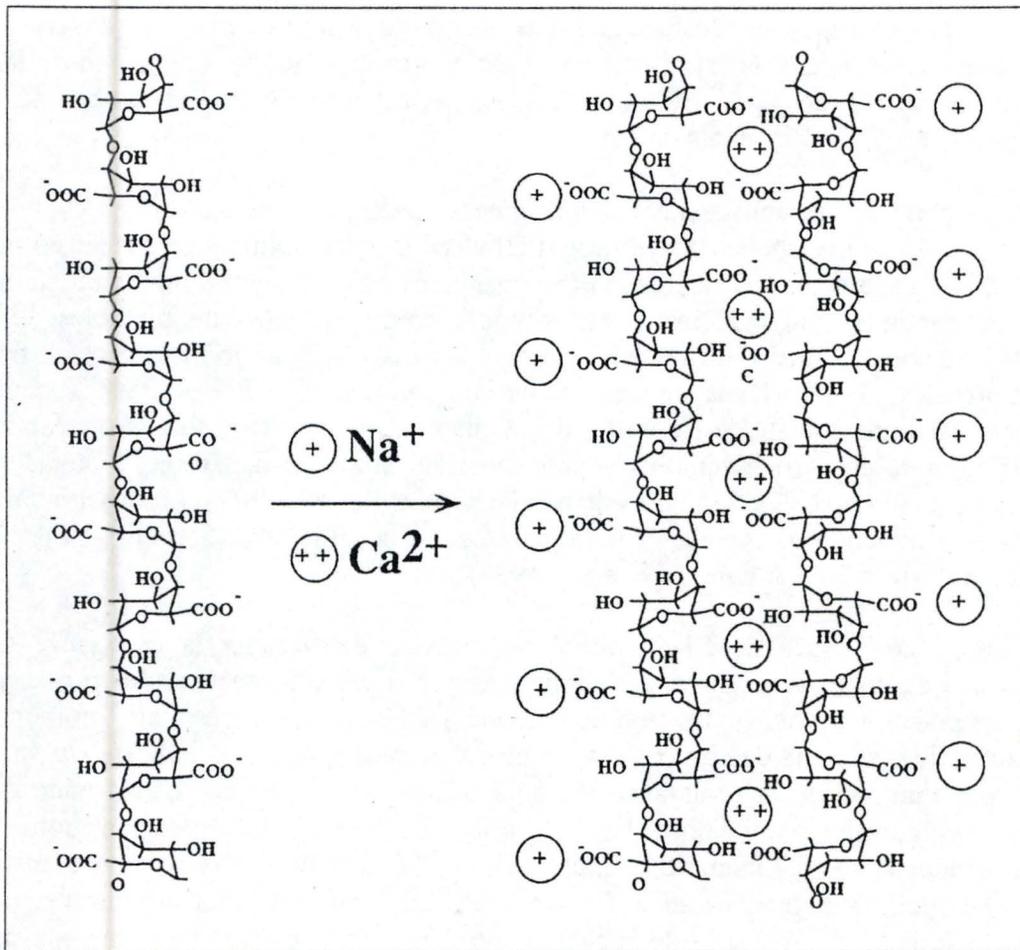


Figure 2.2.2: Association coopérative de 2 chaînes pectiques, en présence de Calcium. Structure en boîte à oeufs (Van Cutsem, 1996).

inefficace; on expliquera plus tard les hypothèses émises à ce sujet dans le chapitre consacré à la caractérisation du signal pectique.

3. Caractéristiques du signal pectique

Un premier point concerne la concentration des fragments. On observe 2 types de concentrations déclenchant chacune une réponse spécifique:

- les réponses de défense qui sont déclenchées par des concentrations élevées. En effet, des concentrations de l'ordre de 10^{-4} M étaient nécessaires lors de l'activation de la casbène synthase (Jin and West, 1984)
- les effets morphogéniques: la floraison ou le mûrissement des fruits demandent des concentrations beaucoup plus faibles, de 10^{-8} à 10^{-6} M.

Cette discrimination dose dépendante permettrait à la plante de faire la différence entre les processus de dégradation pathogénique et ceux résultant de l'action de polygalacturonases endogènes: des concentrations faibles sont suffisantes à l'activation des réponses morphogènes sans pour autant déclencher des processus de défense (Van Cutsem and Messiaen, 1994) souvent défavorables à la croissance (synthèse de lignine, choc oxydatif, nécrose) (Ryan and Farmer, 1991).

La nature polyanionique des pectines a fait penser que les charges négatives du polymère ionisé pouvaient jouer un rôle. On a alors testé l'effet inducteur d'autres polyanions (oligomanuronides, chondroïtine sulfate, dextran sulfate, ...) aussi bien dans l'induction de la formation de fleurs (Marfà *et al.*, 1991) que dans les réponses de défenses (Jin and West, 1983) et on a montré l'inefficacité de ces substances dans les deux cas. Bien que les charges semblent importantes, d'autres facteurs doivent intervenir.

La taille et la structure des fragments apparaissent comme des éléments prépondérants.

Pour ce qui est de la taille, un degré de polymérisation minimum de 9 acides galacturoniques revient constamment dans la littérature (Ryan and Farmer, 1991, Nothnagel *et al.*, 1983, Jin and West, 1983, Marfà *et al.*, 1991). A l'exception de la synthèse d'inhibiteurs de protéases qui sont connus pour être activés par des acides di- et trigalacturoniques, la taille minimum semble être de 9 alors que la limite maximale se situe aux alentours de 15.

Comme nous l'avons déjà signalé, Marfà proposait en 1991 une explication possible à cette dépendance de taille des oligogalacturonides biologiquement actifs: une taille minimum pourrait être requise pour que les pectines adoptent la conformation reconnue par leur récepteur alors que la taille maximale pourrait refléter l'incapacité du fragment à se placer dans son récepteur ou à y accéder (Marfà *et al.*, 1991) En 1984, Jarvis propose dans son article sur la structure et les propriétés des gels pectiques dans les parois cellulaires végétales, qu'au-dessus de 16 unités d'acide galacturonique, les fragments pectiques seraient capables de former des multimères (Jarvis, 1984) ce qui va également dans le sens d'une perte d'accessibilité au récepteur.

Le polymère pectique seul ne peut cependant être un éliciteur actif que s'il se présente sous sa forme caractéristique en « egg-box » (figure 2.2.2). Cette fixation coopérative de 2 chaînes pectiques via l'intermédiaire d'ions bivalents comme le calcium a été montrée comme

étant à l'origine de l'augmentation du calcium cytosolique dans des cellules de carotte (Mesiaen *et al.*, 1994). Le rapport $\text{CaCl}_2 / \text{NaCl}$ utilisé dans ces expériences était comparable à celui utilisé par Liners pour reconnaître les fragments pectiques avec l'anticorps monoclonal 2F4 (Liners *et al.*, 1989). L'épitope reconnu par cet anticorps possède la même conformation (egg-box).

En 1996, Penel décrivait des protéines liant les pectines. En absence de calcium on observait une chute drastique de leur affinité pour les acides gacturoniques (Penel and Greppin, 1996).

On peut donc en conclure que les caractéristiques du signal pectique sont la concentration, la taille et la conformation.

4. Transduction du signal pectique

On en vient à aborder le mode d'action des pectines. En 1996, Mathieu indique que la phosphorylation dans les premiers temps après la stimulation par des fragments pectiques pourrait être impliquée dans la transduction du signal. On venait de mettre en évidence deux protéines (95 kDa et 20 kDa) qui étaient phosphorylées suite à l'application d'oligogalacturonides (Mathieu *et al.*, 1996).

Des études menées avec des inhibiteurs de protéines kinases (staurosporine et 6-diméthylaminopurine) ont montré que ceux-ci étaient capables d'inhiber la stimulation de la voie des phénylpropanoïdes résultant de l'application de fragments pectiques chez *Nicotiana tabacum*. L'application d'un inhibiteur de phosphatases, la cantharidine, était capable d'activer le choc oxydatif et l'alcalinisation extracellulaire tout comme le faisait l'application d'oligogalacturonides. Les inhibiteurs de protéines kinases inhibent ces deux phénomènes. Ces résultats confirment bien l'implication de la phosphorylation de protéines dans ces deux réponses membranaires (Mathieu *et al.*, 1996). Les deux protéines phosphorylées (95 kDa et 20 kDa) peuvent être le substrat de protéines kinases ou être des protéines kinases s'autophosphorylant (Mathieu *et al.*, 1996).

Il est intéressant de constater que ces réponses précoces peuvent induire la génération de signaux secondaires transmis vers le génome de la plante. (Mathieu *et al.*, 1996)

A ce stade, on sait que la phosphorylation a lieu mais on ne connaît encore aucun récepteur aux acides polygalacturoniques. On a alors cherché s'il existait des protéines pouvant interagir avec les pectines. Pour ce faire, on a inclus des fragments pectiques dans une matrice d'acrylamide, en présence de Ca^{++} , et on a placé le tout dans une colonne. On a ensuite fait passer une solution de protéines d'hypocotyles de *Cucurbita pepo* L. Il s'est avéré qu'il existait seulement un petit nombre de protéines pouvant se fixer aux pectines. Les protéines récupérées après élution de la colonne ont été identifiées comme étant des isoperoxydases anioniques et cationiques (il est intéressant de noter que toutes les isoperoxydases n'interagissent pas avec les pectines) (Penel and Greppin, 1996).

L'analyse du type d'interaction formée entre les protéines et les pectines a montré que celles-ci étaient rompues quand on ajoutait du NaCl ou des acides aminés cationiques en grande quantité. Pour être inhibiteurs, ces polycations devaient posséder une certaine longueur et une conformation définie. Le fait que les isoperoxydases étaient anioniques et cationiques semble indiquer qu'une simple liaison ionique aspécifique est très improbable (Penel and Greppin, 1996).

semble indiquer qu'une simple liaison ionique aspécifique est très improbable (Penel and Greppin, 1996).

Les différences d'affinité observées entre la fixation en présence et en absence de Ca^{2+} (30 fois moindre en absence de calcium) suggère que l'interaction pourrait faire intervenir la conformation en egg-box. Cette conformation en egg-box du complexe $\text{PGA}/\text{Ca}^{2+}$ exposerait les charges négatives dans une conformation spatiale favorable. Cette notion de « conformation favorable » explique pourquoi les fragments pectiques sans calcium, même présentant les charges nécessaires, ne peuvent fixer les isopéroxydases (Penel and Greppin, 1996).

Un travail récent montre que la peroxydase anionique de courgette se lie en fait sur des fragments pectiques suffisamment longs pour prendre leur conformation en boîte à oeufs (egg-box) en présence de calcium (Penel et al., 1999).

Du côté protéique, on suggère que les protéines se liant au PGA contiennent deux ou plusieurs acides aminés basiques disposés de telle manière qu'ils correspondent « géographiquement » aux charges négatives exposées par les chaînes de $\text{PGA}/\text{Ca}^{++}$. Cette reconnaissance permettrait la fixation de protéines de manière localisée afin d'exercer la fonction catalytique à l'endroit requis (Penel and Greppin, 1996).

On constate que le traitement de cellules en suspension de tabac avec des oligogalacturonides stimule les efflux de K^+ , la dépolarisation membranaire, l'alcalinisation du milieu de culture, l'acidification du cytoplasme et l'entrée de calcium. Seuls les oligogalacturonides ayant un DP entre 9 et 16 sont actifs avec un pic d'expulsion de K^+ pour les fragments de 12 (Mathieu *et al.*, 1991).

Ces efflux de K^+ résultent probablement de la dépolarisation membranaire. La diminution du pH interne se fait en parallèle avec l'augmentation du pH extracellulaire et proviendrait de l'échange K^+/H^+ . Par après, le retour à la normale du pH cytosolique pourrait provenir d'une consommation métabolique de H^+ . Après 2 heures, on constate une diminution de l'efflux de K^+ . Cette diminution ne semblerait pas due à la dégradation des fragments pectiques actifs par des enzymes de dégradation, car si on rajoute des oligogalacturonides, on n'observe qu'une très faible augmentation: il existerait, à l'instar des cellules animales, une période réfractaire pendant laquelle les cellules végétales resteraient nonstimulables (Mathieu *et al.*, 1991).

Dans des études menées sur des cellules de carotte, on a montré que les fragments de taille adéquate (DP de 9 à 16) et dans leur conformation en egg-box étaient capables d'activer la PAL. L'activité PAL (phénylalanine amonia-liase, enzyme de la voie des phénylpropanoïdes) a ensuite été analysée suite à l'utilisation de différents modulateurs (Messiaen and Van Cutsem, 1994).

Si on utilise un ionophore de calcium (Br-A23187) à la place des fragments pectiques, on observe une augmentation du calcium cytosolique suffisante pour activer la PAL comme le fait la pectine. L'ionophore de calcium augmente significativement le calcium cytosolique, mais n'a pas d'effet sur la dépolarisation de la membrane, ni sur l'acidification intracellulaire (Messiaen and Van Cutsem, 1994).

Si on applique du verapamil, un inhibiteur de canaux calcium, on n'a plus d'activité PAL, tout en n'ayant pas d'effet inhibiteur sur le volet dépolarisation/acidification de la réponse.

La dépolarisation est clairement dépendante de la taille. L'aspect conformationnel est aussi mis en évidence par la nécessité de la présence du Ca^{2+} . La mobilisation du calcium est indépendante de l'acidification et surtout de la dépolarisation membranaire, excluant par là-même l'hypothèse d'une « porte voltage-dépendante ». Cette indépendance a été établie sur base de l'observation que les fragments peuvent dépolariser et acidifier même sans leur conformation « egg-box ». La mobilisation du calcium semble donc se faire via des canaux voltage indépendants (Messiaen and Van Cutsem, 1994).

L'utilisation d'inhibiteurs de la calmoduline (calmidazolium) fait disparaître la dépolarisation membranaire, l'acidification du cytoplasme et l'activation de la PAL, sans modifier la mobilisation du calcium (Messiaen and Van Cutsem 1994). On peut donc penser qu'il se forme un complexe calcium-calmoduline, celui-ci étant connu pour pouvoir interférer avec des protéines kinases et pouvant être responsable de l'inhibition de la pompe à protons membranaire, via phosphorylation, conduisant à l'acidification du milieu, la dépolarisation et la libération du K^+ . Cette dernière hypothèse concernant la phosphorylation pouvant peut-être être rapportée à l'observation de protéines membranaires phosphorylées suite à la stimulation par des fragments pectiques (Mathieu *et al.*, 1996).

5. Les pectines chez *Sinapis alba* (L.)

Les nombreuses données publiées, concernant les effets des oligogalacturonides chez les plantes, nous ont poussés à étudier l'évolution du contenu en pectines au niveau du méristème, lors de la transition florale chez *Sinapis alba* (L.).

Ces études ont été rendues possibles grâce à l'existence d'un anticorps monoclonal, le 2F4, dirigé contre les pectines dans leur conformation en « egg-box ». Cette conformation particulière provient de la complexation de deux chaînes de pectines acides (désestérifiées) en présence de calcium. Cet anticorps, synthétisé au cours de la thèse de doctorat de F. Liners a entre autre permis de mettre en évidence que la synthèse et la sécrétion de polymères pectiques se faisaient sous forme hautement estérifiée (Liners and van Cutsem, 1992).

Le 2F4 a permis la mise en évidence de l'importance de la conformation en egg-box dans la détermination de l'action élicitrice des fragments pectiques. Dans un article publié en 1993 concernant l'activation de la PAL dans des protoplastes de carottes, Messiaen *et al.* ont démontré que les oligogalacturonides possédant une activité élicitrice disposaient non seulement d'un DP supérieur à 9, mais que la conformation en boîte à oeufs, reconnue par l'anticorps, était indispensable à l'activité élicitrice de ces fragments. Cette même dépendance de taille et de conformation a été ensuite également mise en évidence en 1994 par Van Cutsem and Messiaen, dans une publication relative à l'accumulation de transcrits de gènes de défense dans des cellules de carottes en suspension.

Par la suite, le 2F4 a permis à S. Sobry, pendant son mémoire, d'obtenir des données concernant le contenu en pectines du méristème. Ces résultats sont à l'origine du travail réalisé au cours du semestre écoulé. Pour mieux comprendre les résultats obtenus, un rappel de la technique est nécessaire.

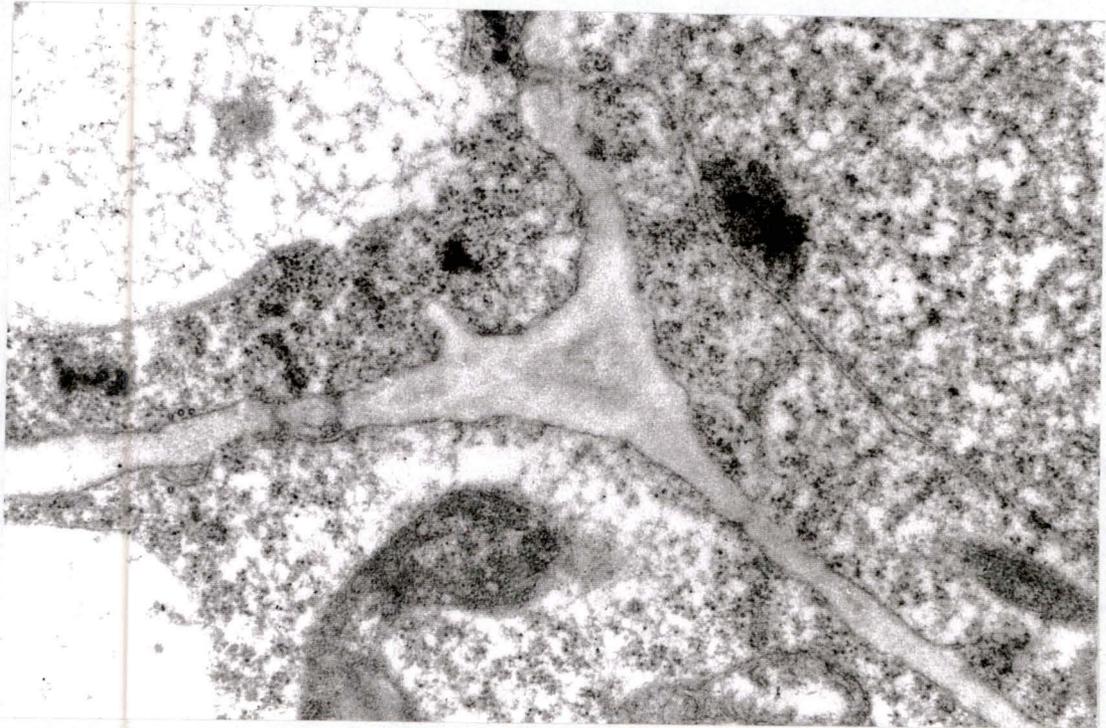


Figure 2.2.3: *Marquage des coupes sans désestérification préalable au NaOH (S.Sobry).*

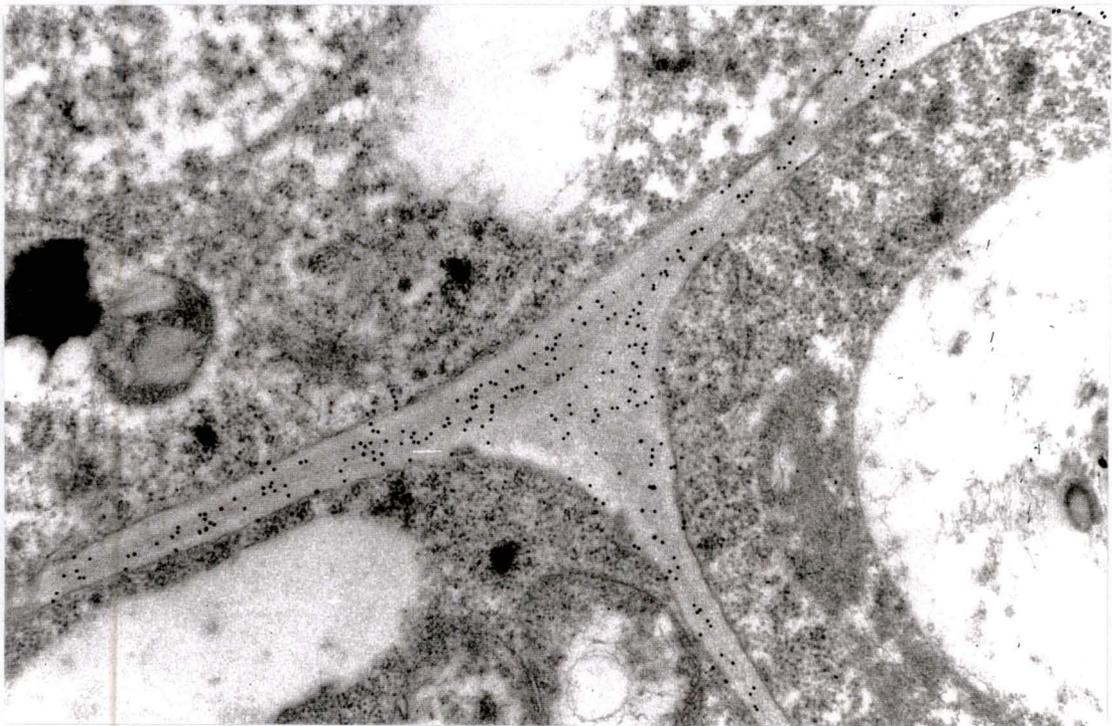


Figure 2.2.4: *Marquage des coupes après désestérification au NaOH (S. Sobry).*

Les bourgeons apicaux des plantes végétatives et induites sont prélevés à différents temps après le début du jour long. Les échantillons sont fixés et inclus dans du LRWhite, une résine hydrophyle permettant le marquage immunocytochique.

La détection des pectines se fait via un anticorps primaire, le 2F4, dirigé contre les pectines en « egg-box ». Ces structures se forment quand on met des chaînes de pectines acides de plus de 9 unités en présence avec du calcium. L'ion bivalent est complexé par les deux chaînes qui s'assemblent alors de manière coopérative.

Préalablement au marquage, une étape de saturation des sites non spécifiques, réalisée avec du lait en poudre, est nécessaire. Cette étape est réalisée grâce à du lait en poudre. On incube ensuite les échantillons en présence avec le 2F4. Il s'ensuit une étape de rinçage et une seconde incubation en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal. L'or, dense aux électrons apparaît comme un point noir sur l'image en microscopie électronique à transmission. Le contrastage des coupes se fait à l'acétate d'uranyle.

Une expérience préliminaire a été réalisée sur des coupes « à l'état natif », c'est-à-dire n'ayant subi aucun traitement autre que la fixation et l'enrobage. Cette expérience n'a fait apparaître aucun marquage (figure 2.2.3). Ces résultats sont à mettre en rapport avec la sécrétion sous forme estérifiée des fragments pectiques: sous cette forme, ils ne peuvent être reconnus par l'anticorps.

Le traitement des coupes au Na OH, avant incubation avec l'anticorps, met en évidence les pectines totales (figure 2.2.4) en retirant les groupements méthyles et acétyles, ce qui les rend accessibles au 2F4. L'analyse au niveau des zones de jonction et de paroi suivie d'un traitement statistique des données obtenues, a permis de constater une diminution importante de marquage dès la 20^{ème} heure, aussi bien au niveau des zones de jonction que des zones de paroi. Cette diminution correspond, si on se rappelle le principe de l'expérience, à une diminution du contenu en pectines totales au niveau du méristème entre les plantes végétatives et les plantes ayant subi l'induction (Mémoire de S. Sobry, Université de Liège, 1997).

Cette diminution ne peut s'expliquer que par des phénomènes de dégradation. Ces dégradations font intervenir des polygalacturonases. Cependant, leur action ne peut se faire que sur des pectines acides (sans groupements méthyles ou acétyles). L'intervention d'enzymes impliquées dans les processus d'acidification des pectines semble donc indispensable; les PME en sont les enzymes clés. Une analyse de l'évolution des PME dans l'apex au cours de la transition florale permettra peut-être d'ouvrir une porte vers l'explication de l'origine de la dégradation des pectines.

3 Les pectines méthylestérases

Les PE (pectines estérases) catalysent la désestérification des pectines, ce qui a notamment pour effet de provoquer une augmentation de la susceptibilité à la dégradation par les enzymes pectolytiques, produisant des fragments dont les fonctions ont déjà été évoquées précédemment.

Les pectines méthylestérases sont, au même titre que les polygalacturonases, des pectinases (Albani *et al.*, 1991). Ces protéines interviennent dans les phénomènes de croissance et de différenciation cellulaire.

Les PME sont des enzymes ubiquistes associées aux parois cellulaires et qui catalysent la déméthylation des acides polygalacturoniques méthylestérifiés (Turner *et al.*, 1996), générant des groupes carboxyliques libres dans les parois cellulaires (Richard *et al.*, 1994). On a proposé que cette déméthylation est nécessaire à la complexation du calcium par les pectines, menant à la stabilisation de la lamelle mitoyenne. Ceci constitue une des modifications d'interaction entre les composantes structurales de la paroi, modification médiée par les PME. Les changements d'estérification peuvent affecter le pH et les balances ioniques.

Les PME sont indispensables aux phénomènes de dégradations des pectines car celles-ci sont hautement méthylestérifiées au moment de leur synthèse et de leur sécrétion (Jarvis, 1984).

Chez la tomate, lors du mûrissement, les PME semblent réguler la capacité à fixer les cations et la sélectivité envers les ions (Tiemann and Handa, 1994). Une telle variété de fonctions au sein des PME suggère l'existence de multiples enzymes possédant des caractéristiques différentes (Glover *et al.*, 1996). On a pu montrer qu'il existait de nombreuses isoformes au sein de chaque espèce, qu'il s'agisse d'*Arabidopsis thaliana* (Micheli *et al.*, 1997), du peuplier (Guglielmino *et al.*, 1997) ou de la tomate (Gaffe *et al.*, 1994).

Les PME se distinguent par leur poids moléculaire, leur point isoélectrique et leurs propriétés biochimiques. On distingue trois types de PME sur base de leurs caractéristiques de pI. On distingue les formes acides, neutres et alcalines. Ces trois formes se distinguent notamment au niveau de leur mode d'action.

En effet, les PME alcalines sont connues pour agir linéairement sur la chaîne principale des polygalacturonides (Markovic and Kohn, 1984 in Guglielmino *et al.*, 1997). Il y a alors formation de longues sections de pectines acides pouvant complexer du calcium. Le gel ainsi formé entraverait l'expansion cellulaire.

Les PME neutres, quant à elles, agiraient de façon aléatoire tout au long des molécules de pectines en prévenant les processus d'agrégation en présence de calcium. La prédominance des formes neutres dans les cellules actives pourrait alors permettre l'expansion cellulaire (Guglielmino *et al.*, 1997). La fonction des PME acides est encore indéterminée.

L'expression de certaines PME est localisée, comme dans le cas de la PME spécifique du fruit chez la tomate. En parallèle, d'autres isoformes sont observées aussi bien dans les organes végétatifs que dans les fruits de ces mêmes tomates (Gaffe *et al.*, 1994, Guglielmino *et al.*, 1997, Albani *et al.*, 1991).

BP19 et PPE1 sont deux PME exprimées dans le pollen. Alors que l'accumulation des m-RNA de BP19 augmente au cours de la croissance et diminue dans le grain de pollen mature (*Brassica napus*) (Albani *et al.*, 1991), PPE1 atteint son niveau le plus haut en fin de maturation et est toujours présent lors de la germination. Cette PME pourrait intervenir dans la dégradation d'une partie du contenu en pectine de la paroi interne du grain de pollen pour lui faciliter la germination. Elle pourrait aussi aider à la croissance du tube pollinique en dégradant les pectines dans les tissus du style, les produits de dégradation pouvant alors être récupérés pour la synthèse de nouvelles parois (*Petunia inflata*) (Mu *et al.*, 1994). Comme on le voit, ces deux PME, bien que s'exprimant au même endroit, ne le font pas au même moment et ne semblent pas intervenir pour la même fonction. Il paraît donc exister une grande spécificité de régulation de leur action.

Bien que très diverses, les PME possèdent une série de caractéristiques communes. On peut distinguer 2 régions dans les PME:

La région carboxyterminale contient quatre séquences conservées qui se retrouvent dans les PME des plantes aussi bien que dans celles de champignons ou de bactéries. Ces régions sont probablement impliquées dans le site actif de l'enzyme (Ebbelaar *et al.*, 1996, Mu *et al.*, 1994). Ces régions sont QALA, QDTL, GTXDFIFG et YLGRPW.

Du côté aminoterminal, on retrouve une séquence hydrophobe présentant les caractéristiques d'un peptide signal (Albani *et al.*, 1991). Un site de clivage potentiel est également présent. Il est probable que cette séquence leader N terminale dirige la protéine du réticulum endoplasmique vers l'apoplasme (paroi cellulaire) (Richard *et al.*, 1994). Il est aussi possible qu'elle intervienne dans l'inactivation ou la stabilisation pendant l'exportation (Albani *et al.*, 1991) en jouant un rôle de chaperone intramoléculaire (Seidah, 1995 in Micheli *et al.*, 1997). Cette région est hautement variable et serait clivée pour obtenir la protéine mature.

Dans la plante, les PME sont liées ioniquement aux parois cellulaires. La présence de PME a été rapportée dans des zones riches en pectines acides (non estérifiées). L'activation des PME ferait intervenir des cations: ceux-ci relâcheraient les molécules initialement fixées aux groupes carboxyliques présents le long des chaînes pectiques. Les cations interviendraient non seulement pour empêcher les PME de se fixer aux groupements carboxyliques libres, mais aussi en modifiant la conformation des pectines (Borderave *et al.*, 1996).

III Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

0. Matériel végétal et conditions de culture

Les plantes (*Sinapis alba*) sont cultivées depuis le semis dans des phytotrons où règnent les conditions suivantes:

- température de l'air: 20°C
- humidité relative: +/- 70%
- éclairage: 145-150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ au niveau des jeunes feuilles (tubes fluorescents V.H.O. Sylvania).

Les graines sont semées sur du terreau Brill 1; elles sont ensuite recouvertes de substrat et arrosées abondamment. Après 10 jours, les plantes sont repiquées individuellement en pots de huit centimètres de diamètre sur un mélange de perlite et de vermiculite (1/1). Pendant 9 semaines, les plantes sont maintenues à l'état végétatif par une culture en JC de 8 heures. Elles mesurent alors 20 à 25 cm et possèdent une quinzaine de feuilles. Lorsque les plantes sont âgées de 65 jours, elles sont prêtes pour l'induction florale par un JL (repris du mémoire de licence de S. Sobry).

1. Clonage des sondes

1.1. Extraction de l'ADN génomique de *Sinapis alba*

1.1.1. Composition des solutions utilisées

tampon d'extraction (10 ml) pH 7.5

| | |
|----------------------------|----------|
| pH:7.5 | 10 ml |
| Tris 200 mM | 0.242 gr |
| CTAB 2% | 0.2 gr |
| NaCl 1.4M | 0.818 gr |
| EDTA 20 mM | 0.074 gr |
| β mercapotéthanol 1% | 0.1 ml |

Solution CTAB NaCl

| | |
|-----------|----------|
| | 10 ml |
| CTAB 10% | 1 gr |
| NaCl 0.7M | 0.041 gr |

Milieu de précipitation

| | |
|----------------|----------|
| pH: 7.5 | 10 ml |
| Tris 50 mM | 0.060 gr |
| EDTA 10 mM | 0.037 gr |
| CTAB 1% | 0.1 gr |

Solution NaCl

| | |
|---------|----------|
| | 1 ml |
| NaCl 1M | 0.058 ml |

Mélange chloroforme-octanol (24:1) à préparer et à garder à l'abri de la lumière.

1.1.2 Matériel utilisé

Centrifugeuse minifuge: Heraeus sepateck Biofuge 13
 Centrifugeuse « 4000 rpm »: Hermle BHG (ZK364)

1.1.3 Protocole

- peser 3 gr de jeunes feuilles
- placer dans un mortier
- couvrir d'azote liquide.
- broyer jusqu'à obtention d'une poudre fine
- placer dans un tube Falcon de 50 ml
- ajouter 6 ml de tampon d'extraction (CTAB 2x)
- incubé 40 minutes dans un bain à 60 °C
- mélanger par inversion toutes les 10 minutes
- ajouter 3 ml de chloroforme-octanol (24:1)
- mélanger par inversion pendant 5 minutes
- centrifuger 10 minutes à 4000 rpm (température ambiante)
- récupérer la phase aqueuse
- ajouter 10% en volume de CTAB 10 %, NaCl 0.7 M.
- mélanger, ajouter 3 ml de chloroforme octanol (24:1) et mélanger par inversion pendant 5 minutes
- centrifuger 10 minutes à 4000 rpm (température ambiante)
- récupérer le surnageant aqueux
- ajouter 1 volume de milieu de précipitation
- mélanger et laisser précipiter 30 minutes à température ambiante
- centrifuger 10 minutes à 4000 rpm et éliminer le surnageant
- ajouter 450 µl de NaCl 1 M
- incubé à 56°C pendant 5 minutes sous agitation pour dissoudre le précipité gélatineux
- transvaser dans un Eppendorf et ajouter 2 volumes d'éthanol 96% à - 20°C
- placer à - 70°C pendant 10 minutes
- centrifuger à 13.000 rpm (minifuge), 2 min., 4°C
- éliminer le surnageant et laver le culot d'ADN 2 fois avec 500 µl d'éthanol 76% (- 20 °C).
- sécher sous vide pour éliminer l'éthanol résiduel (ne pas trop dessécher le culot)
- resuspendre l'ADN dans 400 µl de Tris 10 mM EDTA 1 mM (pH 8.0) en plaçant le tube dans un agitateur rotatif à 4°C pendant une nuit.

1.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose utilisé sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connues. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille : l'ADN du phage λ coupé par Hind III et la Smart Ladder.

1.2.1. Marqueurs de tailles.

| | | |
|---|-------------------|-----------|
| l'ADN du phage λ coupé par Hind III : | Smart Ladder | 5 μ l |
| Bande de 23130 pb | Bande de 10000 pb | 100 ng |
| Bande de 9416 pb | Bande de 8000 pb | 80 ng |
| Bande de 6557 pb | Bande de 6000 pb | 60 ng |
| Bande de 4361 pb | Bande de 5000 pb | 50 ng |
| Bande de 2322 pb | Bande de 4000 pb | 40 ng |
| Bande de 2027 pb | Bande de 3000 pb | 30 ng |
| Bande de 800 pb | Bande de 2500 pb | 25 ng |
| Bande de 700 pb | Bande de 2000 pb | 20 ng |
| Bande de 600 pb | Bande de 1500 pb | 15 ng |
| Bande de 564 pb | Bande de 1000 pb | 100 ng |
| Bande de 125 pb | Bande de 800 pb | 80 ng |
| | Bande de 600 pb | 60 ng |
| | Bande de 400 pb | 40 ng |
| | Bande de 200 pb | 20 ng |

1.2.2. Solution et tampon utilisés

Solution de chargement (5 fois concentrée) : 40 % de glucose
0,025 % bleu de bromophénol

Tampon TAE (1 fois concentré) : Tris-acétate 40 mM (pH = 8,0)
EDTA 1 mM

1.2.3. Matériel utilisé

Cuve d'électrophorèse: Pharmacia LKB GNA100

1.2.4. Protocole

- Porter à ébullition 50 ml de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Quand la solution est refroidie (aux environs de 50°C), ajouter 3 μ l de bromure d'éthidium (solution stock à 2 mg/ml).
- Couler l'agarose sur le support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse (Mini-PROTEAN II Cell, BIO-RAD) contenant du tampon TAE (1x).
- Déposer les échantillons dans les puits (8 μ l d'échantillon + 2 μ l de solution de chargement) et effectuer la migration à l'intensité désirée (de 75 à 80 mA).

Visualiser l'ADN du gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm)

1.3. Polymerase Chain Reaction

1.3.1. Composition d'un milieu réactionnel de 50 μ l

- x μ l d'ADN matrice
- 1 μ l d'amorce gauche (10 à 100 pm par réaction)
- 1 μ l d'amorce droite (10 à 100 pm par réaction)
- 5 μ l tampon commercial concentré 10 X avec Mg
- 0.2 à 0.4 μ l de Taq polymérase (1 à 2 unités, Taq Boehringer Mannheim, stock à 5 U/ μ l)
- compléter avec l'eau stérile

1.3.2. Matériel utilisé

Appareil PCR: Mini Cyclor™ MJ Research (Biozym)

1.3.3. Programme typiquement utilisé pour l'amplification d'ADN génomique de *Sinapis alba*

| Etape | température C° | Temps min. | Nombre de cycles |
|---------------------|-------------------|---------------|---------------------|
| Dénaturation longue | 94 | 10 | |
| Dénaturation | 94 | 1 | 8X |
| Hybridation | 50 | 1 | |
| Elongation | 72 | 1 | |
| Dénaturation | 94 | 1 | 24X |
| Hybridation | 65 | 1 | |
| Elongation | 72 | 1 | |
| Terminaison | 72 | 10 | |

1.4. Purification de fragments d'amplification

1.4.1. Purification via colonnes Amicon Microcon 100

Pour la purification de maximum 500 µl de produit d'amplification, une colonne Microcon 100 (AMICON)

- ajuster le produit de PCR à 500 µl avec de l'eau millipore stérile
- poser le tout sur la colonne
- centrifuger le système colonne tube Eppendorf 15 minutes à 7000 rpm (minifuge)
- remplacer le tube Eppendorf
- retourner le tube et ajouter 20 µl d'une solution de Tris-HCl 5 mM pH 8
- incubé 5 min.
- centrifuger 15 min. à 4000 rpm, pour récupérer l'ADN

1.4.2. Purification par précipitation à l'éthanol

- amener la solution à une concentration finale de 0.2/0.35 M en NaCl et/ou KCl
- ajouter 2 volumes d'éthanol absolu
- incubé 1 heure à - 20 °C
- centrifuger à 4°C, 13000 rpm pendant 20 à 30 minutes
- éliminer le surnageant et drainer
- laver avec 1 ml d'éthanol 70%
- centrifuger 13000 rpm, 4°C 10 minutes
- éliminer le surnageant et drainer
- sécher sous vide 2 à 3 minutes
- bien resuspendre dans l'eau millipore stérile.

1.4.3. Purification par extraction de gel

Réaliser un gel d'agarose préparatif. Réduire la quantité de bromure d'éthidium et minimiser l'exposition du gel sous la lampe U.V. lors de l'excision. L'extraction du gel se fait via le kit QIAEX II Agarose Gel Extraction commercialisé (QIAGEN).

- exciser la bande de DNA du gel d'agarose avec une lame de scalpel stérile
- minimiser au maximum la taille du morceau de gel en retirant les excès d'agarose

- utiliser un tube microfuge de 1.5 ml pour 250 mg d'agarose
- peser la tranche de gel
- ajouter 3 volumes de tampon QX1 à un volume de gel pour des fragments de DNA de 100 bp à 4 kb
- resuspendre la résine QIAEX II en vortexant 30 secondes
- ajouter QIAEX II en accord avec le tableau ci-dessous et mélanger.

| | |
|---------------------------------|---------------------------|
| ≤ 2 µg de DNA | ajouter 10 µl de QIAEX II |
| 2-10 µg de DNA | ajouter 30 µl de QIAEX II |
| par 10 µg de DNA supplémentaire | ajouter 30 µl de QIAEX II |

L'adsorption du DNA à QIAEX est seulement efficace à $\text{pH} \leq 7.5$. Après qu'un morceau de gel soit dissout, vérifier le pH; s'il est supérieur à 7.5, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M à pH 5.0, mélanger et vérifier le pH. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

- incuber à 50°C pendant 10 minutes. Mélanger toutes les 2 minutes pour garder la résine QIAEX II en suspension
- centrifuger les échantillons pendant 30 secondes et retirer le surnageant prudemment avec une pipette
- laver le culot avec 500 µl de tampon QX1
- resuspendre le culot en vortexant, centrifuger les échantillons pendant 30 secondes et retirer toute trace du surnageant avec une pipette. Cette étape de lavage retire l'agarose contaminant résiduel
- laver le culot deux fois avec 500 µl de tampon PE. Resuspendre le culot en vortexant. Centrifuger les échantillons pendant 30 secondes et retirer prudemment toute trace de surnageant avec une pipette. Ces étapes de lavage retirent les sels résiduels contaminants
- laisser sécher le culot à l'air libre pendant 10 à 15 minutes jusqu'à ce qu'il soit devenu blanc. Ne pas sécher sous vide. Trop sécher le culot de QIAEX II peut provoquer une diminution de l'efficacité d'élution.
- pour éluer le DNA, ajouter 20 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 ou de l'H₂O et resuspendre le culot en vortexant. Incuber selon le tableau ci-après:

| | |
|--------------------------|--|
| fragments de DNA ≤ 4 kb | incuber à température ambiante pendant 5 minutes |
| fragments de DNA 4-10 kb | incuber à 50°C pendant 5 minutes |
| fragments de DNA > 10 kb | incuber à 50°C pendant 10 minutes. |

Le DNA purifié peut aussi être élué dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) mais l'EDTA peut inhiber des réactions consécutives.

- Centrifuger 30 secondes. Pipeter avec précaution le surnageant dans un tube propre car il contient le DNA purifié.

1.4.4. Purification avec le Kit Wizard (Promega)

- mettre dans un Eppendorf:
 - produit d'amplification (50 µl)
 - 100 µl de tampon de purification direct (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8 à 25°C, 1.5 mM Mg Cl₂, 0.1% Triton X-100)
- vortexer
- ajouter 1 ml de résine
- vortexer à 3 reprises pendant 20 secondes en laissant reposer une minute entre chaque étape d'agitation

- retirer le piston d'une seringue de 3 ml et y attacher une minicolonne
- déposer le mélange dans la seringue et injecter doucement avec le piston
- détacher la seringue de la minicolonne et enlever le piston
- attacher de nouveau la seringue sur la minicolonne et injecter 2 ml d'isopropanol 80% (lavage de la colonne)
- retirer la seringue et placer la minicolonne dans un Eppendorf
- centrifuger 30 secondes à 12000 rpm (séchage de la résine)
- transférer la minicolonne dans un nouveau Eppendorf
- ajouter 30 µl d'eau millipore stérile, incubé 5 minutes
- centrifuger 30 secondes à 12000 rpm (élution)
- l'ADN purifié est stocké à - 20°C jusqu'à utilisation.

1.5. Clonages

1.5.1. Restriction

Composition du milieu de restriction

| | Insert | Vecteur |
|-------------------|------------------|--|
| Taille | 240 bp | 2961 bp (pBluescript II KS +) Stratagène 212207 |
| H ₂ O | 0 µl | 11.5 µl |
| TP 10X | 4 µl | 1.5 µl |
| DNA | 34 µl (20 ng/µl) | 1 µl (1 µg/µl) |
| Xho I (Gibco BRL) | 1 µl (10U/µl) | 0.5 µl |
| Xba I | 1 µl (10U/µl) | 0.5 µl |
| Volume total | 40 µl | 15 µl |

Etape post-restriction: Extraction phénol/chloroforme

Ajuster préalablement le volume des échantillons à 100 µl et la salinité à 250 mM (NaCl) sur base d'un tampon de digestion contenant 50 mM en Na Cl.

- ajouter un volume de solution phénol/chloroforme/alcool isoamilique (25:24:1)
- vortexer trois fois 20 secondes (vitesse la plus faible), laisser reposer entre chaque agitation
- centrifuger à 13000 rpm (microfuge) pendant 3 minutes à température ambiante
- récupérer la phase aqueuse sans toucher l'interface (celle-ci contient les protéines).

Terminer par une précipitation à l'éthanol de l'ADN et resuspendre dans 10 µl d'eau stérile millipore.

1.5.2. Ligation

Composition

| | |
|--------------------------------------|-------|
| - T4 DNA ligase (4U/µl) | 1 µl |
| - ligation buffer 10X | 1 µl |
| - 100 ng plasmide | x µl |
| - 2 fois moins de molécules d'insert | y µl |
| - eau stérile | z µl |
| Volume total | 10 µl |

1.5.4. Transformation

1.5.4.1. Production de bactéries électrocompétentes

La transformation nécessite des bactéries compétentes. Le protocole ci-dessous a été utilisé pour rendre compétentes les bactéries (XL1-blue MRF⁺) fournies avec le plasmide (pBluescript II KS +, Tet^R).

- prélever des bactéries du stock et faire un étalement sur boîte (Agar, Tet+)
- laisser une nuit dans une étuve à 37°C
- le lendemain, prélever une colonie isolée et lancer une culture de nuit (16 heures) dans 10 ml de milieu LB en présence de Tétracycline, avec agitation
- reprendre 5 ml et rediluer dans 200 ml de milieu LB/Tet+
- cultiver à 37°C avec agitation
- les bactéries sont récoltées après 4 à 5 heures en phase exponentielle
- transférer le contenu dans 4 tubes Falcon de 50 ml
- placer sur glace pendant 10 minutes et centrifuger 20 minutes à 4000 rpm 4°C
- décanter, resuspendre dans 20 ml d'H₂O stérile, 10 minutes sur glace
- centrifuger 4000 rpm 4°C pendant 20 minutes
- décanter, resuspendre dans 5 ml d'H₂O stérile, 10 minutes sur glace
- centrifuger 4000 rpm 4°C pendant 20 minutes
- resuspendre dans 5 ml de glycérol 10% stérilisé sur filtre millipore
- centrifuger 20 minutes, 4°C, 4000 rpm
- resuspendre dans 700 µl glycérol 10%
- aliquoter et stocker à -70°C.

1.5.4.2. Transformation par électroporation

Produits utilisés

| | Stock | Concentration finale | dilution dans |
|--------------|----------|----------------------|---------------------|
| Ampicilline | 50 mg/ml | 60 µg/ml | eau stérile |
| Tétracycline | 5 mg/ml | 50 µg/ml | éthanol 99% |
| X-gal | 20 mg/ml | 35 µg/ml | N-diméthylformamide |
| IPTG | 20 mg/ml | 35 µg/ml | eau stérile |

Boîtes de culture: LB/Agar Luria Agar (Gibco BRL), 37 gr/litre.

Protocole

On veillera à éviter au maximum les contaminations bien que celles-ci seront normalement éliminées grâce aux milieux de sélection.

- placer les bactéries XL1 blue compétentes sur glace
- préparer des Eppendorfs contenant 50 µl de bactéries et x µl de la réaction de ligation
- laisser reposer 5 minutes sur glace
- transvaser le contenu dans une cuve à électroporation refroidie à 4°C
- appliquer 25 µF, 200 Ω, 2500 V
- faire le contact jusqu'à obtention du signal sonore
- retirer la cuvette et rajouter directement 1 ml de LB stérile à 4°C
- transférer dans un tube Eppendorf

- incuber 1 heure à 37°C
- étaler sur milieu de sélection.

1.5.4.3. Transformation par heatshock

Les bactéries compétentes (Top 10 F', Tet^R) sont fournies par le kit de transformation « One Shot » (Invitrogen).

- centrifuger brièvement les tubes contenant la réaction de ligation et placer sur glace
- dégeler 50 µl de cellules Top 10 F' pour chaque réaction de transformation et garder sur glace
- ajouter 2 µl de β-mercaptoéthanol à chaque tube de cellules compétentes et mélanger en agitant doucement. Ne pas mélanger les cellules avec une pipette
- ajouter 1 à 10 µl de chaque réaction de ligation aux cellules et directement mélanger doucement
- incuber les tubes sur glace pendant 30 minutes
- incuber ensuite pendant exactement 30 secondes dans un bain d'eau à 42°C. Ne pas mélanger ou agiter
- ajouter 250 µl de milieu SOC préalablement chauffé (fourni dans le kit)
- incuber les tubes une heure à 37°C et procéder à l'étalement sur boîte.

1.6. Sélection

1.6.1. Test blanc/bleu

Le test lac Z, ou test blanc/bleu, est une méthode de sélection de bactéries transformées basée sur la propriété de complémentation intragénique que possèdent les recombinants issus de la transformation.

La souche bactérienne utilisée est déficiente en β-galactosidase. Elle possède cependant un épitope F' dont une partie code pour la région C-terminale inactive α' de la β-galactosidase. La partie N-terminale inactive α est, elle, codée par une portion de gène se trouvant dans le vecteur de transformation.

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 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 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 disruptede 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 vecteurs contenant un petit morceau d'insert produiront un 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.

1.6.2. PCR de sélection

Procéder tout d'abord à un repiquage des colonies potentiellement intéressantes, isolées suite au test blanc/bleu, sur des boîtes Tet+ Amp+ (c'est-à-dire les colonies présentant une coloration blanche) à l'aide d'un cure-dents stérile.

Réaliser une PCR à partir de ces colonies avec des amorces dites « universelles », externes à l'insert, dont les séquences homologues sont présentes sur le vecteur. Le produit d'amplification est chargé sur gel d'agarose 2% et la taille des bandes est estimée par comparaison avec les pistes étalons (Smart Ladder, Eurogentec).

Les séquences des amorces utilisées sont respectivement:

Forward: 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'
Reverse: 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

Le programme utilisé pour cette PCR est le suivant:

| Température (°C) | temps (minutes) | nombre de cycles |
|------------------|-----------------|------------------|
| 94 | 4.5 | 1 |
| 94 | 1.0 | 35 |
| 55 | 1.0 | |
| 72 | 2.0 | |
| 72 | 5.0 | 1 |
| 10 | infini | 1 |

Chaque tube contient:

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| amorce Forward | 10 pm |
| amorce Reverse | 10 pm |
| Tampon 10X | 7 µl |
| DNTP 10 µM | 1.4 µl |
| Taq polymérase | 0.2 µl |
| H ₂ O stérile | 61.2 µl |
| ADN | une colonie de bactéries |
| Volume Total | 70 µl |

1.7. Séquençage

1.7.1. PCR préparative

Les clones positifs sont séquencés. Le séquençage se compose premièrement d'une PCR préparative utilisant des amorces s'hybridant sur des sites externes à l'insert. Nous allons à nouveau utiliser les amorces Forward et Reverse avec le même programme que celui précédemment évoqué. Le produit d'amplification sera ensuite purifié et les fragments à séquencer seront récupérés. On utilise alors ces fragments purifiés pour réaliser la réaction de séquençage proprement dite à l'aide du Kit « ABI PRISM BigDye Sequencing Terminator » commercialisé par la firme ABI PRISM. Le séquençage est réalisé pour chaque fragment au départ de Forward ou de Reverse: on obtiendra ainsi la séquence des deux brins complémentaires. Les fragments obtenus seront ensuite déposés sur gel dans un séquenceur automatique de la même firme.

L'étape de purification consécutive à la PCR préparative peut être réalisée indifféremment via une des différentes méthodes précédemment exposées.

1.7.2. Réaction de séquençage

Composition

La réaction de séquençage se fait avec le kit de séquençage « ABI PRISM BigDye Sequencing Terminator ».

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| - Terminator ready reaction mix | 2 μ l |
| - Tampon de dilution | 6 μ l |
| - Primer F ou R | 7.2 pmoles |
| - Produit PCR | 10 ng (Y μ l) |
| - eau désionisée millipore stérile | X μ l |
| Volume Total | 20 μ l |

Le tampon de dilution contient 200 mM Tris-HCl pH 9 et 5 mM en $MgCl_2$.

Purification des produits de la réaction de séquençage

Suite à la réaction de séquençage, une dernière purification est encore nécessaire pour retirer les restants d'amorce, de nucléotides et d'enzymes:

- ajouter aux 20 μ l de la réaction de séquençage 2 μ l d'acétate de sodium 3M (pH 4,6 amené avec de l'acide acétique) et 50 μ l d'éthanol 96% (-20°C)
- mélanger avec une pipette et transvaser le mélange dans un Eppendorf
- vortexer et incuber sur glace 10 minutes
- centrifuger à 13000 rpm pendant 20 minutes à 4°C (centrifugeuse minifuge)
- éliminer le surnageant en retournant l'Eppendorf sur un papier absorbant
- ajouter 250 μ l d'éthanol 76% à -20°C
- centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C
- éliminer le surnageant en retournant délicatement les tubes Eppendorf
- sécher le culot au SpeedVac pendant 3 à 4 minutes.

Les culots ainsi préparés sont ensuite portés à séquencer. Le séquençage se fait grâce à un séquenceur automatique ABI PRISM 377 DNA Sequencer de Perkin-Elmer.

1.8. Sous-clonage d'un clone existant

On dispose d'une séquence de DNA d'intérêt se trouvant dans un vecteur inapproprié au travail réalisé (absence des promoteurs T3 et T7 nécessaires à la transcription *in vitro*). L'insert doit être transféré du vecteur pMOS vers pBluescript II KS+. Une PCR avec nos amorces dégénérées complémentaires de l'insert présent dans PMOS est réalisée. Les amorces dégénérées utilisées permettront par la suite la restriction et le clonage orienté des fragments d'amplification. Il s'ensuit une purification des fragments, un gel d'estimation, une restriction de l'insert et du vecteur, une purification pour retirer les enzymes de restriction pouvant gêner l'étape suivante qui consiste en une ligation overnight à 14°C. Des bactéries compétentes T10F' sont transformées avec le produit de ligation et étalées sur milieu sélectif. L'évaluation des clones se fait ensuite par PCR et séquençage.

2. Hybridation *in situ*

Le protocole d'hybridation *in situ* (communiqué par le département de Physiologie végétale de l'Université de Liège) est adapté au marquage sur coupes paraffine avec des sondes ^{35}S . Ce protocole est couramment utilisé pour réaliser des études de transcription chez *Sinapis alba* (Bonhomme *et al.*, 1997).

2.1. Prélèvement et fixation des méristèmes apicaux

2.1.1. Matériel et produits

Sterilisation des solutions et de la vaisselle

- *à l'autoclave*:
 - 14 pots de prélèvement
 - 6 flacons Duran de 100 ml
 - flacons pour eau DEPC, tampon phosphate
 - cylindres gradués pour faire les dilutions d'éthanol
 - tampon phosphate:
à préparer avec de l'eau millifiltrée
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 7.163 gr
196 ml d'eau DEPC
 - eau DEPC
2 litres d'eau ultra pure
1 ml de DEPC
- *au four Pasteur (150°C, 48 h.)*:
 - 170 pipettes Pasteur emballées par 10 dans du papier aluminium
 - aiguille montée et scalpel (pointe fine).

Tampon de fixation

200 ml de tampon phosphate/DEPC autoclavé
2 gr de paraformaldéhyde.

Ethanol

Préparer différentes solutions d'éthanol à partir d'éthanol 99.6%: 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 100%. On réalisera les dilutions avec de l'eau DEPC. Réaliser les solutions avec de l'eau DEPC, sous hotte en condition stérile.

2.1.2. Protocole

Les prélèvements ont été réalisés à des temps déterminés après le début du jour long (4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 48h et 96h). Pour chaque temps, prélever des plantes ayant subi l'induction et des plantes maintenues à l'état végétatif. Les prélèvements aux temps 4 et 8 ne seront réalisés que sur les plantes végétatives car la période de photoextension déterminant les plantes induites ne commence qu'après la huitième heure.

Les échantillons passent successivement par les étapes suivantes:

- prélèvement
- fixation paraformaldéhyde
- dégazage 15 minutes sous vide poussé (avec une pompe à huile)
- renouveler le fixateur et laisser une nuit à 4°C (15 heures)

- éthanol 30% (2 heures)
- éthanol 50% (2 heures)
- éthanol 70% (2 heures)
- éthanol 85% (1 heure 30)
- éthanol 90% (1 heure 30)
- éthanol 100% (15 heures)

- bain éthanol/toluol (1 heure)
- bain toluol 1 (1 heure)
- bain toluol 2 (1 heure)
- bain toluol 3 (1 heure)
- bain toluol/paraffine (45 minutes)
- paraffine 1 (1 heure)
- paraffine 2 (1 heure)
- paraffine 3 (2 heures)

- verser de la paraffine dans une cuvette
- placer l'échantillon et l'orienter
- passer sur la plaque refroidissante
- s'assurer de l'orientation; après quelques secondes, l'échantillon est immobilisé
- fermer la cuvette et rajouter la paraffine
- stockage à 4°C.

Ces étapes sont réalisées pour chaque temps. Le timing de celles-ci doit être respecté strictement. On peut cependant allonger l'étape de fixation dans l'éthanol 70% afin de regrouper plusieurs échantillons pour les étapes suivantes (maximum 24 heures). On peut également arrêter les étapes préparatives à l'inclusion au niveau de « paraffine 1 » pour regrouper tous les prélèvements lors de l'inclusion. Stocker à 4°C.

On veillera à numéroter les cassettes à l'aide d'un crayon graphite car les bains dans les solvants organiques dissolvent le marqueur à alcool.

2.2. Préparation des lames et coupe des échantillons

La préparation des lames est une des étapes cruciales de l'hybridation car c'est d'elle que va dépendre l'adhérence des échantillons tout au long des différents bains. On procédera de la manière suivante :

- plonger les lames dans l'acide nitrique concentré pendant 1 heure
- laver les lames en les passant au travers de quatre bains de 15 minutes dans de l'eau désionisée
- plonger les lames dans l'acétone pendant 30 minutes
- sécher au minimum 2 heures au four Pasteur à 180°C
- sortir les lames et quand celles-ci sont refroidies, les plonger dans une solution de Poly-L-Lysine 500 µg/ml (Sigma P-1399)
- un film doit alors se déposer sur la lame
- laisser sécher sous hotte; les lames ainsi préparées restent valables 2 à 3 jours.

Réaliser des coupes de 8 μm d'épaisseur dans les échantillons. Mettre ces échantillons à flotter sur un bain d'eau stérile ultra pure dégazée à 50°C. Découper une section, contenant 5 à 6 échantillons, dans le ruban et procéder à la vérification sous microscope. Chaque lame contient cinq objets. Laisser sécher à 42 degrés pendant une nuit. Les lames pourront être utilisées endéans les quelques jours qui suivent la coupe.

2.3. Préparation des sondes ARN ^{35}S radioactives

2.3.1. Minipréparation plasmidique

La préparation de la sonde nécessite une quantité relativement importante de matrice pour la synthèse de la sonde (1 μg par transcription). Cette matrice, clonée dans le plasmide pBS, sera produite par minipréparation: les bactéries contenant le vecteur seront mises en culture et le plasmide d'intérêt sera ensuite isolé et purifié.

- faire une culture de nuit à 37°C sur agitateur; le milieu de culture contient 10 millilitres de milieu LB, une colonie bactérienne isolée, ampicilline
- le lendemain, remplir 3 Eppendorfs de 1.5 ml avec la culture de nuit
- placer sur glace pendant 5 minutes
- centrifuger 5 minutes à 4°C, 13000 rpm
- retirer le surnageant à la pipette
- resuspendre dans 150 μl de solution à 4°C de glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM
- vortexer brièvement
- incubé 5 minutes sur glace
- ajouter 300 μl de Na OH 0.2M, SDS 1%, et mélanger par inversion
- incubé 5 minutes sur glace
- ajouter 150 μl de K Ac (3M) + H Ac (1.8M) et mélanger par inversion
- incubé 5 minutes sur glace
- centrifuger 15 minutes, 4°C, 13000 rpm
- récolter le surnageant dans un nouvel Eppendorf
- ajouter un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1)
- vortexer 4 x 20 secondes en laissant les phases se séparer entre chaque agitation
- centrifuger 5 minutes, 13000 rpm, 4°C
- récupérer la phase aqueuse dans un nouvel Eppendorf
- ajouter 1 ml d'éthanol 96%
- laisser une heure à -20°C (ou 15 minutes à -70°C)
- centrifuger 20 minutes, 13000 rpm, 4°C
- retirer le surnageant
- laver le culot à l'éthanol 76% (-20°C)
- centrifuger 5 minutes, 4°C, 13000 rpm
- éliminer le surnageant
- sécher sous vide pour éliminer le restant d'éthanol
- resuspendre dans 30 μl d'eau ultra pure
- ajouter 1 μl de RNase A (solution stock à 10 mg/ml) et incubé pendant 1 heure à 37°C.

Etant donné que ces plasmides seront utilisés lors de la transcription *in vitro*, on veillera à éliminer au maximum toute présence de RNAses. C'est pourquoi on réalisera, pour terminer, une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique suivie d'une précipitation à l'éthanol. La pureté de la préparation sera ensuite évaluée via une migration sur gel d'agarose 2%.

2.3.2. Transcription *in vitro*

Le travail en condition RNase free commence à partir de ce point. Il faut en effet éviter toute présence de RNAses pouvant dégrader aussi bien la sonde que les m-RNAs cibles présents sur les coupes.

2.3.2.1. Produits

Le tampon de transcription contient des sels, une solution tampon, du dithiothreitol et d'autres ingrédients afin d'obtenir une efficacité de transcription optimale.

Le mélange d'enzymes est une solution tamponnée, 50% de glycérol, contenant la RNA polymérase (T3 ou T7), des inhibiteurs de RNAses placentales et d'autres composants permettant d'augmenter le taux et la durée de la réaction *in vitro*.

2.3.2.2. Composition

Nous avons accompli la transcription conformément aux instructions recommandées par la firme. Le mélange de transcription se compose, pour un volume final de 20 µl, de:

- 2 µl de tampon de transcription 10X
- 2 µl de solution d' ATP (75 mM)
- 2 µl de solution de GTP (75 mM)
- 2 µl de solution d' UTP (75 mM)
- 1 µl de solution de CTP (75 mM)
- 3 µl de solution de CTP marqué ³⁵S
- x µl de solution de matrice linéarisée
- y µl de solution d'enzymes
- z µl d' eau nucléase free.

2.3.2.3. Protocole

La réaction de transcription est réalisée à 37°C pendant 2 heures. A l'issue de ces 2 heures, un traitement à la DNase Q1 est prescrit (37°C, 15 minutes).

Augmenter le volume de la phase aqueuse à 100 µl, pour plus de facilité lors de la récupération de celle-ci au cours des étapes suivantes. Séparer les protéines présentes dans le milieu via deux étapes successives:

- séparer via 1 volume de phénol/chloroforme (1/1)
- vortexer 4 x 20 secondes en laissant reposer entre chaque étape
- récupérer la phase aqueuse sans toucher l'interface
- séparer via un volume de chloroforme
- vortexer 4 x 20 secondes en laissant reposer entre chaque étape
- récupérer la phase aqueuse sans toucher l'interface.

Précipiter les RNAs 15 minutes à - 70°C ou une nuit à -20°C. La composition du mélange de précipitation est détaillée ci-dessous:

- 1 volume de NH₄ Ac 4M
- 2.5 Volumes d'éthanol
- 0.6 µl de t-RNA 16 µg/µl

- Centrifuger 5 minutes à 13.000 rpm
- récupérer le surnageant pour des comptages ultérieurs de la radioactivité
- faire un rinçage à l'éthanol 70% (200µl)
- centrifuger et garder le surnageant

- resuspendre le culot dans 55 µl de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 20 mM (TED)
- réaliser ensuite une série de comptages au compteur à scintillation

- déposer 1 µl des 55 µl de sondes ou 1 µl des surnageants dans 5 ml de mélange scintillant
- placer le tout dans un tube à scintillation et compter pendant une minute
- les résultats du comptage seront exprimés en cpm.

Après la transcription et l'étape de purification, la taille de la sonde est réduite chimiquement afin d'améliorer l'accessibilité aux tissus: c'est l'hydrolyse carbonate.

- prendre les 55 µl de sonde resuspendues dans le TED
- ajouter 50 µl de tampon carbonate
composition du tampon carbonate: Na HCO₃ 80 mM, Na₂ CO₃ 120 mM pH 10.2
- on incube à 60°C pendant le temps requis déterminé au moyen de la formule ci-dessous:

$$t = (L_o - L_f) / K L_o L_f$$

où: L_o = taille initiale de la sonde
 L_f = taille finale de la sonde (150 pb)
 K = 0.11

Neutraliser la réaction en ajoutant:

- 5 µl d'acide acétique 10%
- 1/10 vol de Na Ac 3M
- 2.5 vol d'éthanol absolu

- bien mélanger le tout, mettre 15 minutes à -70°C ou une nuit à -20°C
- centrifuger 10 minutes à 13.000 rpm (t° ambiante) et rincer à l'éthanol 70% (300 µl)
- jeter les surnageants et resuspendre dans la quantité adéquate de TED
- aliquoter par 5 µl et placer à -70°C.

2.4. Etape d'hybridation

2.4.1. Préhybridation

Cette étape va permettre le déparaffinage, la réhydratation et la préparation à l'hybridation en augmentant l'accessibilité de la sonde envers ses cibles.

2.4.1.1. Déparaffinage

- 3 bains de toluol de 10 minutes chacun (réutilisables ultérieurement)
- plonger les lames 20 secondes dans une série de bains d'éthanol (préparés en eau DEPC stérile ultra pure) à différentes concentrations, respectivement: éthanol 100%, éthanol 100%, éthanol 90%, éthanol 70%, éthanol 50%, éthanol 30%, H₂O, H₂O.

2.4.1.2. Perméabilisation et hybridation

- passer par une solution de protéinase K (1µg/ml dans Tris 100 mM, EDTA 5 mM pH 8) pendant 30 minutes à 37°C (pour plus de facilité, faire une solution stock de protéinase K 10 mg/ml dans TE et aliquoter par 25 µl (250µg/250µl), garder à -20°C)
- laver dans deux bains successifs d'H₂O
- 1 bain de thiéthanolamine H Cl 0.1M pH 8 à température ambiante pendant 15 minutes; on veillera à utiliser une solution fraîchement préparée
- 1 bain d'anhydride acétique 0.25% dans triéthanolamine H Cl 0.1M à température ambiante pendant 15 minutes avec agitation
- deux bains de SSC 2X (0.3M NaCl, 0.03M trisodium citrate) pendant 5 minutes.
- veiller à chauffer la sonde 5 minutes à 80°C et à la refroidir rapidement (dénaturation de la sonde).

2.4.2. Hybridation

- sortir les lames une à une
- les égoutter sans les laisser sécher
- poser 20 µl de solution d'hybridation contenant les sondes
- couvrir avec un couvre-objet 24/36
- mettre les lames dos à dos
- les plonger dans l'huile minérale pendant une nuit à 43°C (entre 14 et 16 heures).

Le milieu d'hybridation se compose typiquement de:

- Tris H Cl pH 8 20 mM
- Na Cl 0.3M
- EDTA 1mM
- solution de Denhart 1X (albumine bovine 0.02%, Ficoll 0.02%, polyvinyl 0.02%)
- t-RNA de levure 500 µg/ml
- DTT 10 mM
- Dextran sulfate 10%
- Formamide désionisée 50%.

Pour 500 µl de solution d'hybridation (25 lames), on utilise:

- 100 µl Tris H Cl 100 mM, EDTA 5 mM, Na Cl 1.5 M
- 5 µl de solution de Denhart 100 x
- 15 µl de t-RNA 16.5 mg/ml
- 25 µl de DTT 200 mM
- 250 µl de formamide
- 100 µl de dextran sulfate 50%

- 5 µl de sonde dans TED préchauffée 5 minutes à 80°C et refroidie rapidement sur glace.

2.4.3 Post-hybridation

- après la nuit d'hybridation, réaliser les bains de lavage et de fixation (les bains ci-dessous peuvent être réalisés avec de l'eau ultra pure non stérile)
- retirer les lames de l'huile minérale et les laisser égoutter verticalement sur un papier absorbant pendant quelques minutes
- déposer les lames dans les paniers porte-lames et faire passer dans différents bains placés sur un agitateur :
- 2 bains de chloroforme pur de 10 minutes chacun
- 1 grand bain de SSC 3X + DTT 10 mM pendant 30 minutes
- 1 autre grand bain de SSC 3X + DTT 10 mM pendant 30 minutes
- 1 bain de SSC 2X + DTT 10 mM pendant 15 minutes
(tous les bains ci-avant sont considérés comme étant radioactifs)
- 1 bain dans le tampon RNase A 1X (Na Cl 0.5M, Tris H Cl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), à température ambiante pendant 15 minutes
- 1 bain de solution RNase 20µg/ml dans le tampon RNase 1X pendant 30 minutes à 37°C
- 2 autres bains dans le tampon RNase 1X à température ambiante pendant 7 minutes 30 secondes (on veillera à utiliser les bains réservés à l'utilisation exclusive des RNases)
- 1 bain de SSC 2X à température ambiante pendant 15 minutes avec agitation
- 1 grand bain (1500 ml) de SSC 0.1X à 55°C pendant 30 minutes avec agitation
- 1 grand bain de SSC 0.1X à température ambiante pendant 10 minutes avec agitation
- passer par une série d'éthanol contenant du NH₄ Ac 0.3M; on passe respectivement par l'éthanol 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (30 secondes dans chaque bain)
- sécher les lames verticalement dans la hotte à flux laminaire
- terminer par la pose de l'émulsion et la coloration au calcofluor.

2.4.4. Composition des solutions utilisées

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>Tampon phosphate</i> | Na H ₂ PO ₄ H ₂ O 0.1M (1/4) Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O 0.1M (3/4) amener à pH 7 et autoclaver conserver à température ambiante |
| <i>Tampon T.E.</i> | Tris 10 mM EDTA 1 mM amener à pH 8 conserver à température ambiante |
| <i>Tampon T.E.D</i> | T.E + DTT 20 mM filtrer sur filtre 0.22 µm (Sterile Acrodisc® Gelman Sciences) amener à pH 8 conserver au frigo |

| | |
|--|--|
| Tampon carbonate 0.2M | Na HCO ₃ 80 mM Na ₂ CO ₃ 120 mM ajuster à pH 10.2 autoclaver et garder à -20°C |
| Solution stock 10 x de tampon T.E pour traitement à la protéinase K | Tris 1 M EDTA 50 mM amener à pH 8 et autoclaver conserver à température ambiante |
| Sl. stock de tp. RNase 5X | Tris 50 mM EDTA 5 mM Na Cl 2.5 M ajuster à pH 8 conserver à température ambiante |
| Paraformaldéhyde 2% | préparer dans du tampon phosphate veiller à travailler stérilement |
| DTT 500 mM Fluka 43819 | à préparer avec de l'eau DEPC filtrer sur filtre 0.22 µm garder à -20°C |
| Dextran sulfate 50% Sigma D-7037 | préparer avec de l'eau DEPC stocker à -20°C |
| NH₄ Ac 4M | préparer avec de l'eau DEPC filtrer et placer dans un flacon stérile à préparer juste avant et à garder au frigo |
| Sl. pour le milieu d'hybr. | Tris H Cl 100 mM EDTA 5 mM (Sigma E-5134) Na Cl 1.5 mM autoclaver et stocker à température ambiante |
| Solution Denhart 100 X | BSA 2 % (Stratagene 300041) Ficol 2 % (Sigma F-2637) PVP 2 % (Sigma P-5288) aliquoter et stocker à -20°C |
| Solution de T RNA Boehr. Manheim 84771921 | 16.5 ng/ml préparer avec de l'eau DEPC aliquoter et stocker à -20°C |
| Sl. stock SSC 20X | Na Cl 3M citrate de sodium 0.3 M autoclaver et garder à température ambiante |
| Protéinase K | 10 mg/ml dans T.E 1 X aliquoter par 25 µl puis stocker à -20°C |

| | |
|---|--|
| RNase A | 25mg/2.5ml de RNase A 1X aliquoter par 500 µl et stocker à -20°C |
| H₂O DEPC Fluka 32490 | 0.05 % dans de l'eau millipore autoclaver et conserver à température ambiante |
| RNase T1 | 1µl / 250 ml (100.000 U/ml) |

2.5. Pose de l'émulsion et développement des coupes

Toutes les manipulations décrites ci-dessous se dérouleront dans une chambre noire pourvue d'un éclairage inactinique.

2.5.1. Matériel et produits

Pose de l'émulsion

- émulsion Kodak NTB2 conservée au frigo dans une boîte noire scellée à la toile isolante
- plaque chauffante avec cristalliseur d'eau (servant de bain-marie)
- thermomètre
- spatule en plastique (important car l'utilisation d'une spatule en métal risque de réduire les grains d'argent, augmentant par là-même le bruit de fond)
- 1 borel, entouré de papier aluminium, avec de l'eau distillée, à 40-42 °C, placé dans le bain-marie
- boîte noire avec chlorure de calcium (pour le stockage des lames microscopiques couvertes d'émulsion avant révélation)
- lumière avec filtre Ilford F904
- portoir pour égoutter les lames (rack à tubes Falcon)
- 60-70% d'humidité et 20% (on peut atteindre 60% d'humidité en prévoyant la veille deux bacs d'eau sur un plaque chauffante dont la température est réglée à 20-25°C).

Développement

- 1 bac de révélateur Microdol X-pro à 20°C (Kodak-522 1304)
- 2 bacs d'eau distillée à 20°C
- 1 bac de fixateur Acidofix à 20°C
- 1 minuterie
- les lames à révéler
- des paniers à lames
- un thermomètre
- lumière avec filtre F904 (Ilford).

2.5.2. Protocole

Pose de l'émulsion

- A un volume d'eau chaude déterminé dans le borel, ajouter une goutte de glycérol et de l'émulsion à volume égal à l'eau, sans peser, avec la spatule en plastique. (1/2 volume d'eau, 1/2 vol d'émulsion, quelques gouttes de glycérol)
- laisser réchauffer l'émulsion quelques minutes (tous les composants doivent avoir la même

température)

- mélanger lentement avec la spatule de plastique
- laisser reposer environ 5 minutes
- tester l'émulsion, éviter les bulles d'air dans l'émulsion
- plonger les lames individuellement pendant une à deux secondes dans l'émulsion puis les égoutter verticalement dans le portoir
- quand les lames sont sèches, les disposer dans un boîte noire fermée hermétiquement et les conserver au frigo jusqu'à la révélation.

Développement

- plonger les lames 5 minutes dans le révélateur, puis 1 minute dans deux bains successifs d'eau désionisée, 8 minutes dans le fixateur, deux fois 1 minute dans l'eau.
- laisser sécher les lames ou les déshydrater dans des bains d'éthanol de concentration croissante.

2.6. Coloration des lames

Cette coloration va utiliser le calcofluor, colorant qui apparaîtra bleu sous éclairage ultra-violet.

- Après avoir révélé les lames, les laisser sécher dans l'étuve une nuit ou plus
- plonger les lames dans l'eau (*Sinapis*, 3h)
- plonger les lames dans de l'alcool 100 (*Sinapis*, 3h)
- colorer les lames dans un bac en verre
mettre 4 aliquotes de 1 ml de calcofluor 0.1 % et immerger dans l'eau distillée
durée: 20 minutes à température ambiante
ne pas rincer
- monter les lames directement avec le milieu de montage Sigma (1000-4) (3 gouttes)
- poser le couvre-objet
- mettre en chambre froide à l'obscurité
- le lendemain, sceller avec un baume (DPX) (Fluka 44581).

2.7. Observation des lames

Les lames ainsi traitées seront observées via un microscope photonique Leitz Diaplan équipé d'un fond noir et d'un éclairage fluorescent. Le fond noir permettra de faire apparaître le marquage mais on constate que les parois cellulaires apparaissent également. L'éclairage U.V. (filtre BP340480, miroir dichroïque RKP400, filtre d'arrêt LP430) simultané permet d'atténuer fortement cette réfringence induisant une fluorescence.

L'observation se fera à un grossissement de 125 ou 275 fois. Les photographies se feront préférentiellement avec des films dia 400 ASA.

IV Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Clonage en vue de la production de sondes ARN ³⁵S radioactives

Ce travail vise à mettre en évidence les m-RNAs de PME transcrits au niveau du méristème de *Sinapis alba* (L.) au cours de la transition florale. Aucune séquence de PME provenant de *Sinapis* n'a pu être trouvée dans les banques de données (Genbank).

En analysant la littérature, il est cependant apparu qu'il existait, au sein de toutes les PME, 4 régions hautement conservées faisant probablement partie du site actif de la protéine. Ces séquences se retrouvent aussi bien chez les végétaux ou les bactéries que chez les champignons. Il est dès lors fort probable que ces quatre séquences soient également présentes chez *Sinapis alba*. Des amorces complémentaires de ces régions semblaient donc utilisables pour amplifier un ou plusieurs segments de gènes de PME.

Les PME sont des enzymes ubiquistes. Chaque plante en contient de nombreuses isoformes dont l'expression est soit constitutive soit restreinte dans le temps et l'espace. Les conditions dans lesquelles nous avons procédé étant hautement restrictives, un mélange de sondes a été utilisé. De cette manière, il est peu probable que toutes les sondes soient dirigées contre des isoformes non exprimées dans le méristème au moment des prélèvements.

1.1. Résultats de l'extraction du DNA génomique de *Sinapis alba*

Suite à l'extraction du DNA, un gel d'électrophorèse a été réalisé (Agarose 2%). Les résultats sont illustrés ci-dessous. Les trois premières pistes résultent de la migration de 1 µl de notre produit d'extraction. La dernière piste contient l'étalon 23 kd (caractéristiques de l'étalon dans le Matériel et méthodes).



Figure 4.1: Migration sur gel d'agarose 2% du produit de l'extraction du DNA génomique de *Sinapis alba* (L.).

L'ADN observé est bien pur et ne contient pas de trace de dégradation. La remise en solution n'est peut-être pas optimale car une hétérogénéité dans l'intensité des différentes bandes est constatée. Un second gel d'agarose 2% (non illustré) a été réalisé avec l'étalon Smart Ladder. Une concentration de 150 à 200 ng d'ADN génomique par µl de solution a pu être estimée.

```

atpme3      328 KKKNIMFMGDGRTRTIIITGSRNVVDGSTTFHSATVAAVGERFLARDITFQNTAGPSKHQA
os0188      47  KKKNIMFMGDGRTRTIIITGSRNVVDGSTTFHSATVAAVXRKIP-----
atpme2      318 KKTNIMFLGDGRGKTIITGSRNVVDGSTTFHSATVAAVGERFLARDITFQNTAGPSKHQA
atpcra      1  -----
Lepme3      279 KKMNLMIIVGDGMNATIIITGSLNVVDGS-TFPSNTLAAVQGQFILQDICIQNTAGPEKDQA
atpcrc      1  -----
atpme1      327 SKWNVMIYGDGKGKTIISGSKNFVDGTPTYETATFAIQGKGFIMKDIGIINTAGAAKHQA
atpcrb      1  -----
atpme4      323 KKNNIFMFGDGARKTVISYNRSVALSRGTTTSLSATVESEGFMAKWMGFKN TAGPMGHQA
ewpmeb      196 AGATINTT---CSAVMWSQSNDFQLKNLTVVNALLD TVDSGTHQAVALRTD--GESG-AT

atpme3      388 VALRVGSDFSAFYNCMLAYQDTLYVHSNRQFFVKCLIA GTVDFIFGNAAAVLQDCDIHA
os0188      -----
atpme2      378 VALRVGSDFSAFYQCDMFAYQDTLYVHSNRQFFVKCHIT GTVDFIFGNAAAVLQDCDINA
atpcra      1  -----XGTXDFIFGNSAVVFQNCDIVA
Lepme3      338 VALRVGADMSVINRCRIDAYQDTLYAHSQRQFYRDSYVT GTVDFIFGNAAAVVFQKCQIVA
atpcrc      1  -----XGTXDFIFGAGTVVVFQCSIRP
atpme1      387 VAFRSGSDFSVYYQCSFDGFQDTLYPHSNRQFYRDCDVT GTIDFIFGSAAVVFQGCKIMP
atpcrb      1  -----XGTXDFIFGNAAAVVFQDCNLYP
atpme4      383 AAIRVNGDRAVIFNCRFDGYQDTLYVNNGRQFYRNCVVS GTVDFIFGKSATVIQNTLIVV
ewpmeb      250 GKCPAQPSDTEFFVNTSDRQNSYVTDHYSRAYIKDSYIE GDVDYVFGRATAVFDVRVREHT

atpme3      448 RRPNSGQKNMVTAQG-RTDPNQNTGIVIQKCRIGATSD LQSVKGSFPTYLGRPWKEYSQT
os0188      -----
atpme2      438 RRPNSGQKNMVTAQG-RSDPNQNTGIVIQNCRIGGTS D LLAVKGTFTPTYLGRPWKEYSRT
atpcra      23  RNPAGAGQKNMLTAQG-REDQNQNTAISIQKCKITAS S D LAPVKGSVKTYXGRPWKEYS--
Lepme3      398 RKPKNRQKNMVTAQG-RTDPNQATGTSIQFCDI I ASPDLEPVMNEYKTYLGRPWKKHSRT
atpcrc      23  RQPLPNQFN TITAEG-TQEANQNTGISIHQCTI SP-----NGNVTATTYXGRPWKEYS--
atpme1      447 RQPLSNQFN TITAQG-KKDPNQSSGMSIQRCTI SA-----NGNVIAPT YLGRPWKEFSTT
atpcrb      23  RQPMQNQFN AITTAQG-RTDPNQNTGISIYNCTI KPADDLVSSNYTVKTYXGRPWKEYS--
atpme4      443 RKGSKGQYNTVTADGNELGLGMKIGIVLQNCRI VPDRKLT PERLTVAT YLGRPWKKFSTT
ewpmeb      310 VS-SRGSKEAYVFAP-DSIPSVKYGFLVINSQLTGD ---NGYRGAQKAKLGRAWDQGAQO

atpme3      507 VIMQSAISDVIRPEGWSEWT-GTFALNTLTYREYSNT GAGAGTANRVKWRGFKVITAAAE
os0188      -----
atpme2      497 VIMQSDISDVIRPEGWHEWS-GSFALDTLTYREYLNR GGGAGTANRVKWKGYKVITSDE
atpcra      -----
Lepme3      457 VVMQSYLDGHIDPSGWFEWR-GDFALKTLTYGEFM NNGPGAGTSKRVKWPYHVITDPNE
atpcrc      -----
atpme1      501 VIMETVIGAVVRPSGWMSWVSGVDPASIVYGEYKNT GPGSDVTQRVKWAGYKPVMSDAE
atpcrb      -----
atpme4      503 VIMSTEMGDLIRPEGWKIWD-GESFHKSCRYVEYNNR GPGAFANRRVNWA--KVARSAAE
ewpmeb      365 TGYLPGKTAN-----GQ---LVIRDSTIDSSYDL ANPWGAAATTDRPFKGNISPQRDL

```

Figure 4.2: *Alignement des séquences de PME en acides nucléiques et mise en évidence des régions conservées utilisées pour la détermination des amorces.*

1.2. Détermination des amorces

Des amorces complémentaires des régions conservées précédemment mises en évidence ont été déterminées. L'approche semble intéressante, d'autant plus qu'elle a déjà été réalisée avec succès par Micheli pour isoler, chez *Arabidopsis thaliana*, une série de séquences partielles de PME reprises sous la dénomination « AtPME_{epc} A/G » (de A jusque G) (Micheli *et al.*, 1997).

Des alignements sur base des séquences en acides aminés et nucléiques ont été réalisés. Les résultats de ces alignements ont permis de déterminer une paire d'amorces dégénérées possédant la plus grande probabilité de s'hybrider chez *Sinapis alba*.

Bien que les régions utilisées soient remarquablement bien conservées, il nous a semblé plus intéressant de réaliser les alignements majoritairement sur base de séquences d'une crucifère proche de *Sinapis* et dont un grand nombre de séquences sont connues: *Arabidopsis thaliana*. Des séquences de PME de tomate et de bactérie ont également été intégrées.

| Nom détaillé | abréviations utilisées | Accession Number |
|--|------------------------|------------------|
| <i>A. thaliana</i> AtPME3 | Atpme3 | AF033204 |
| <i>A. thaliana</i> OS 0188 « putative PME » | OS0188 | U75596 |
| <i>A. thaliana</i> AtPME2 | Atpme2 | U25649 |
| <i>A. thaliana</i> clone AtPME _{epc} A | Atpcra | AF033205 |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> LePME3 « fruit specific » | Lepme3 | U70676 |
| <i>A. thaliana</i> clone AtPME _{epc} C | Atpcrc | AF033207 |
| <i>A. thaliana</i> AtPME1 | Atpme1 | X81585 |
| <i>A. thaliana</i> clone AtPME _{epc} B | Atpcrb | AF033206 |
| <i>A. thaliana</i> AtPME4 « flower specific » | Atpme4 | AF077855 |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> pemB | Ecpemb | X84665 |

Les séquences auxquelles nous faisons référence ci-dessous ont permis la réalisation des alignements. Elles sont disponibles sur le site internet NCBI Entrez, Nucleotide QUERY, en précisant le numéro d'accession. Les programmes Clustal et Boxshade ont été utilisés pour exécuter les alignements.

La figure 4.2 illustre le résultat de l'alignement des séquences en acides aminés. Les séquences GTXDFIFG et YLGRPWK sont, comme prévu, hautement conservées.

Sur base de l'alignement en bases, la dégénérescence la plus probable a été déterminée: nous avons à chaque fois éliminé les bases les moins représentées quand des différences apparaissaient lors de l'alignement. L'alignement apparaît en figure 4.3. La distance entre ces 2 régions conservées est d'environ 225 paires de bases (régions conservées incluses).

Des sites de restrictions ont été ajoutés aux amorces pour contrôler et restreindre l'insertion au site choisi. Quelques bases ont été ajoutées à chacun des sites de restriction afin d'augmenter l'efficacité de la restriction. Certaines modifications ont également été apportées

```

atpme2 4397 TGGGACAATCGACTTCATTTTCGGAA-GTGCTGCGGTCGTTTTCCAAGGCTGCAAATCA
atpme1 1332 TGGGACAATCGACTTCATTTTCGGAA-GTGCTGCGGTCGTTTTCCAAGGCTGCAAATCA
atpcrc 2 TGAACA-TCGATTTTCATTT-CGGAG-CTGGCAGTCGTCTTCCAAGGCTGCAGCATCC
atpcra 2 TGAACA-TCGATTTTCATTT-CGGAA-ACTCTGCTGTGGTATCCAGAACTGCGACATCG
atpcrb 2 TGAACA-TCGATTTTCATTT-CGGCA-ATGCAGCTGTTGTGTCCAAGACTGTAATCTCT
lepme3 1794 AGGTAAGTGTGATTTTCATATTTGGTA-ATGCAGCAGTTGTATTCCAGAAAATGTCAGATCG
atpme3 2922 CGGAACCGTTGACTTCATCTTCGGAA-ACGCCCGTCGTGCTCCAAGACTGTGACATCC
os0188 -----
atpme4 2184 GGAACAGTAGACTTCATCTTCGGCA-AATCCGCAACCGTGATCCAAAACACACTAATTG
ewpemb 1596 TGGCAA-CAGTCATGTTTTCTGAGTGCACCCCATTAGTTGGATAATCGTCCAACAACG

atpme2 4456 T--GCCTCGCCAGCCTCTTTCTAACCAATTCAACACCATAACCGCT--CAGGGCA--AAA
atpme1 1391 T--GCCTCGCCAGCCTCTTTCTAACCAATTCAACACCATAACCGCT--CAGGGCA--AAA
atpcrc 59 G--TCCGCGTCAGCCGCTTCCGAATCAGTTCAACACAATCACCAGCT--GAAGGTA--CAC
atpcra 59 T--GGCAGCAAATCCTGGAGCTGGGCAAAAGAACATGTTAACGGCT--CAAGGAC--GGG
atpcrb 59 A--TCCAAGACAACCGATGCAGAACCAGTTCAACGCTATTACAGCT--CAAGGTC--GTA
lepme3 1853 T--AGCTAGAAAACCGAATAAAAGACAGAAAAACATGGTGACTGCA--CAAGGCA--GGA
atpme3 2981 A--CGCTCGCCGCCCTAATTCGGTGCAGAAAAACATGGTCACAGCT--CAGGGAA--GAA
os0188 -----
atpme4 2243 T--TGTCCGTAAAGGAAGCAAGGGACAATACAACACGGTCACAGCC--GATGGAAACGAA
ewpemb 1655 AGTGCACCTTATATTTATTGGCAAAAATCACACCAGAAATCAGGCTGGCCCGCTACCGGA

atpme2 4510 AAGATCCGAACCA-AAGCTCGGGGATGTCGATTCAACGATGCACTAT--CTCCGCAA--
atpme1 1445 AAGATCCGAACCA-AAGCTCGGGGATGTCGATTCAACGATGCACTAT--CTCCGCAA--
atpcrc 113 AAGAGGCCAATCA-GAACACGGGAATATCGATCCACCAATGCACAAT--CTCTCCCAA--
atpcra 113 AGGATCAGAACCA-GAACACCGCCATTCGATCCAAAATGTAAGAT--AACGGCTAGTT
atpcrb 113 CTGATCCGAATCA-AAACACGGGAATTCGATTTACAATTGTACGATTAACCGGCAG--
lepme3 1907 CGGACCCAAATCA-GGCCACGGGGACATCAATTCAGTTCTGTGACAT--AATTGCAAGTC
atpme3 3035 CGGATCCTAACCA-GAACACAGGGATCGTTATCCAGAAATGTAGGAT--CGGTGCCACGT
os0188 -----
atpme4 2299 TTGGGCTTAGGGATGAAAATTGGTATCGTCCTCCAAAACGTCGAT---CGTGCCCGAC
ewpemb 1715 AT-ATCTTCGCGCTTTCGCCAGTAAAAGGATCTTGGTAAAGTCTATGGCGTTGGGGAAA

atpme2 4565 CGGC-----AATGTGATTGCT-CCCACGTATCTTGGCCGGCCGTGGAAGGA
atpme1 1500 CGGC-----AATGTGATTGCT-CCCACGTATCTTGGCCGGCCGTGGAAGGA
atpcrc 168 CGGA-----AATGTAACGCT-ACGACGTAT-TTGGTCGCC--TGGAAGGA
atpcra 170 CGGAT-CTTGCTCCTGTAAAAGGATCTGTG-AAAACGTAT-TTGGTCGCC--TGGAAGGA
atpcrb 170 ATGAT-TTGGTTTCGAGTAACTATACGGTT-AAAACGTAT-TTGGTCGCC--TGGAAGGA
lepme3 1964 CGGAC-CTAGAACC-AGTCATGAATGAATACAAAACATATCTTGGTAGGCCATGGAAAAA
atpme3 3092 CGGAT-TTACAGTCGGTGAAGGATGTTTT-CCGACGTACTTGGGTGCGCCATGGGAAGGA
os0188 -----
atpme4 2356 AGGAACTAACGCCAGAGAGACTTACGGTG-GCGACATACTTGGGAAGGCCGTGGAAGAA
ewpemb 1774 CGGCTATTGCA-----CGATGGCTCAGATTCTGGCGTCATCTGGCCTATTTTCTCAGAG

atpme2 4610 GTTTTCCACGACGGTTATTATGGAGACGGTGATTGGAGCAGTGGTTCGACCGTCCGGGTG
atpme1 1545 GTTTTCCACGACGGTTATTATGGAGACGGTGATTGGAGCAGTGGTTCGACCGTCCGGGTG
atpcrc 210 ATATTC-----
atpcra 225 ATATTC-----
atpcrb 225 ATATTC-----
lepme3 2022 ACATTCAAGAACGGTAGTGATGCAATCATACCTAGATGGTCATATTGATCCATCAGGTTG
atpme3 3150 ATATTCACAAACGGTGATAATGCAGTCGGCTATCTCCGACGTGATCCGACCCGAAGGGTG
os0188 -----
atpme4 2415 ATTCTCGACCACCGTGATAATGAGCACCAGATGGGAGATTTGATTAGACCAGAAGGGTG
ewpemb 1828 CAGAAAAAGTATCGGCATCATTATCAACGCGCTGGCCGAACGCTCCACGCCATCAGGGGG

```

Figure 4.3: *Alignement des séquences en bases et mise en évidence des régions conservées utilisées pour la détermination des amorces.*

afin d'optimiser les caractéristiques thermodynamiques des amorces. Deux amorces, une « gauche » et une « droite », toutes deux dégénérées, ont pu être définies; leurs séquences se trouvent ci-après:

Amorce gauche: dégénérescence 184

CGACTCGAGCGGGGDACWRTMGAYTTCATYTTTCGGM
XhoI

Amorce droite: dégénérescence 72

GCGTCTAGAGCACTTCCARGGVCGDCCMAGRTA
XbaI

| |
|---------|
| R= AG |
| M= AC |
| S= GC |
| Y= C, T |
| K= G, T |
| H= ATC |
| B= GTC |
| D= GAT |
| N= ATGC |
| V= GAC |
| X= CI |
| W= AT |

La taille attendue des fragments amplifiés avec ces amorces est d'environ 250 paires de bases.

1.3. Amplification sur ADN génomique de *Sinapis*

Les amorces ainsi définies ont été utilisées pour réaliser une amplification sur de l'ADN génomique extrait de jeunes feuilles de *Sinapis alba* (L.). Le programme utilisé se divise en deux parties. La première présente une température d'hybridation de 50°C. Cette température permet quelques cycles dans des conditions de plus faible stringence. Cette option a été choisie car nous utilisons des amorces dégénérées dont l'efficacité d'hybridation est indéterminée étant donné que la séquence cible est inconnue. Après ces huit premiers cycles, l'étape d'hybridation peut être plus restrictive: on poursuit alors par une série de 24 cycles dont la température d'hybridation est augmentée à 65°C.

| Etape | température C° | Temps min. | Répétition |
|---------------------|-------------------|---------------|------------|
| Dénaturation longue | 94 | 10 | |
| Dénaturation | 94 | 1 | 8X |
| Hybridation | 50 | 1 | |
| Elongation | 72 | 1 | |
| Dénaturation | 94 | 1 | 24X |
| Hybridation | 65 | 1 | |
| Elongation | 72 | 1 | |
| Terminaison | 72 | 10 | |

Cette opération est réalisée deux fois consécutivement. En effet, le rendement de la première PCR ne permet pas de mettre en évidence les fragments d'amplification. Il est donc nécessaire de reprendre 5 µl du premier produit d'amplification pour réaliser une seconde réaction de PCR dans les mêmes conditions. La mise en évidence des bandes après migration sur gel d'agarose 1% est alors possible

SL 1 2 3 4 5 6 7 8 9 SL



10 11 12 13 14 15 16 17 18 SL



5 μ l de chaque produit d'amplification sont déposés au sommet de chaque piste (1/10 du volume total). 5 μ l de solution Smart Ladder constitue notre étalon de taille et de concentration. Les différents marqueurs de poids moléculaire se situent à 200 pb (20), 400 pb (40), 600 pb (60), 800 pb (80), 1000 pb (100), 1500 pb (15), 2000 pb (20), 2500 pb (25), 3000 pb (30), 4000 pb (40), 5000 pb (50), 6000 pb (60), 8000 pb (80) et 10000 pb (100). Entre parenthèses sont indiquées les quantités de chaque fragment présentes dans 5 μ l de Smart Ladder. Ces valeurs sont données en ng.

- Les pistes 1 et 2 sont des contrôles négatifs sans ADN
- Les pistes 3 à 6 sont des produits d'amplification obtenus après PCR sur 200 ng d'ADN génomique de *Sinapis*
- Les pistes 7 à 10 sont des produits d'amplification obtenus après PCR sur 100 ng d'ADN génomique de *Sinapis*
- Les pistes 11 à 14 sont des produits d'amplification obtenus après PCR sur 50 ng d'ADN génomique de *Sinapis*
- Les pistes 15 à 18 sont des contrôles avec un ADN génomique de *Sinapis* provenant d'une autre extraction.

Une bande aux environs de 250 paires de bases est observée sur chaque piste; il s'agit donc bien d'une amplification spécifique. L'absence de bande dans le contrôle négatif indique qu'aucun ADN contaminant n'était présent lors de la réaction.

Les fragments obtenus sont d'un ordre de grandeur concordant par rapport à la taille attendue, obtenue sur base des alignements, qui était d'environ 225 bp. La taille observée ressemble également à la taille des fragments obtenus par Micheli qui sont de l'ordre de 200 bp (Micheli, 1997).

1.4. Clonage des sondes

Les fragments obtenus doivent être restreints en vue du clonage. La restriction se fera par les enzymes XhoI et XbaI.

Le choix du vecteur s'est fait en tenant compte du but de ce clonage: la production de sondes ARN radioactives en vue du test d'hybridation *in situ*. Cette production va faire intervenir des réactions de transcription *in vitro*. Deux types de transcrits sont nécessaires: les transcrits anti-sens qui constituent les sondes, et les transcrits sens qui permettent la réalisation de contrôles négatifs. Ces deux transcriptions se font au départ de deux promoteurs situés de part et d'autre de l'insert et orientés en sens opposés. Un vecteur possédant ces caractéristiques a dû être choisi: notre choix s'est tourné vers pBluescript II KS+ car ayant

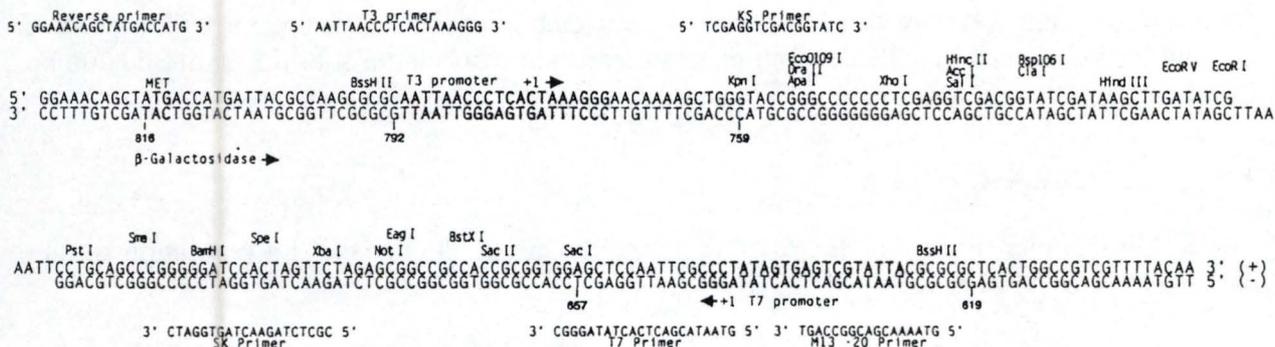
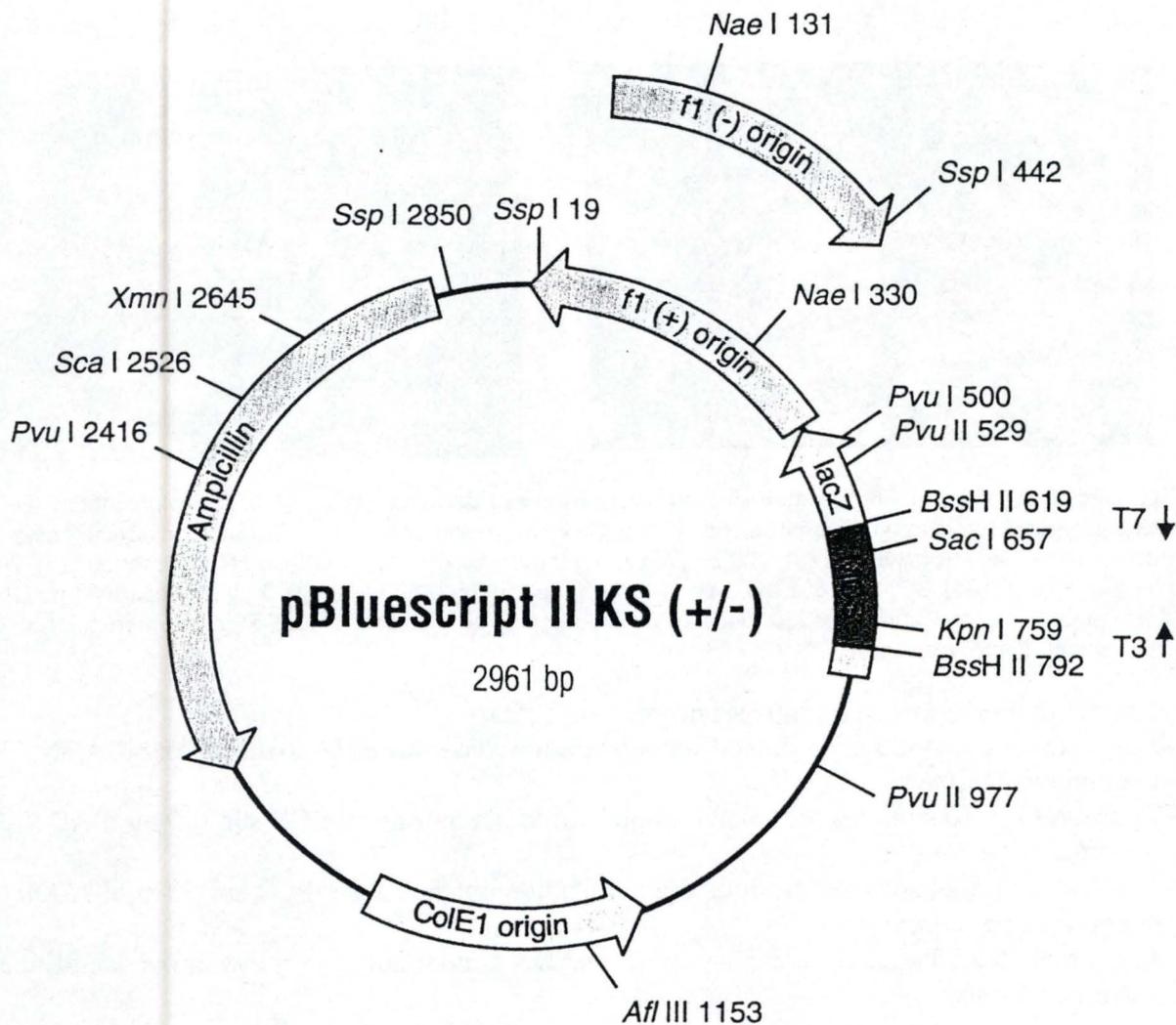


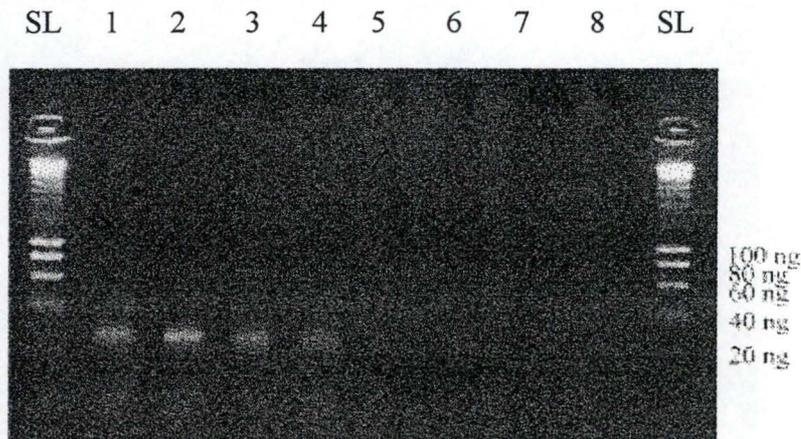
Figure 4.4: *pBluescript II KS +*

déjà été utilisé pour des travaux similaires par Bonhomme (Bonhomme *et al.*, 1997). Ce vecteur est illustré en figure 4.4.

Ce vecteur, d'une taille de 2961 pb, contient un gène de résistance à l'ampicilline et le gène lac Z dans lequel est inséré le site multiple de clonage contenant les promoteurs T3 et T7. lac Z permettra la réalisation de tests blanc/bleu. L'insertion de nos fragments d'intérêt dans le site multiple de clonage disruptera lac Z qui, étant devenu inefficace, laissera apparaître des colonies blanches. Le milieu de culture classique se composera d'ampicilline (résistance conférée par le vecteur), de tétracycline (résistance conférée par la bactérie), de x-gal et d'IPTG pour la réalisation du test blanc/bleu.

Avant restriction, les fragments amplifiés sont préalablement purifiés comme détaillé dans le chapitre concerné au matériel et méthodes. En pratique, nous avons constaté que le rendement de fragments purifiés sur colonne était de loin inférieur à la technique de précipitation à l'éthanol. Cette méthode sera préférée quand il faudra purifier des fragments inférieurs à 350 bp. Pour les fragments supérieurs, les différentes colonnes utilisées offrent toutes de bons rendements. Les colonnes Microcon (Amicon) sont celles utilisées le plus fréquemment du fait de leur grande rapidité.

La détermination de la concentration finale en ADN après purification est réalisée par comparaison des intensités des bandes témoins de la Smart Ladder et de celles obtenues avec diverses quantités de solution de purification.



Gel d'agarose 2%

La méthode de précipitation à l'éthanol a été utilisée dans ce cas. 100 μ l de produit de purification sont obtenus après remise en suspension. On dépose 5 μ l de cette solution dans les puits 1 et 2, 2.5 μ l dans les puits 3 et 4, 1 μ l dans les puits 5 et 6 et enfin 0.1 μ l dans les puits 7 et 8. En comparant avec les bandes témoins de la Smart Ladder, nous estimons la concentration de notre produit de purification à 20 ng par μ l.

1.4.1. Restriction des inserts et du vecteur

L'étape de restriction est réalisée comme précisé dans Matériel et méthodes. Après restriction, les fragments sont purifiés. Cette purification vise à retirer les enzymes de restrictions pouvant interférer avec les ligases. On quantifie sur gel d'agarose 2% (non illustré). La concentration finale de l'insert est estimée à 10 ng par μ l pour un volume total de 10 μ l. Pour le vecteur, cette estimation est de 70 ng par μ l, toujours pour un volume total de 10 μ l.

1.4.2. Ligation

Pour la ligation, il est nécessaire d'utiliser deux fois plus de molécules d'inserts que de molécules de vecteurs. Sachant que 100 ng de vecteur, dont la taille est de 3000 pb, sont utilisés, nous aurons besoin de 16.6 ng des fragments amplifiés (250 pb).

La réaction de ligation se compose de (dans un volume total de 10 μ l) :

- 1.42 μ l de la solution de vecteur à 70 ng/ μ l
- 1.66 μ l de la solution d'insert à 10 ng/ μ l
- 1 μ l de tapon (10X)
- 1 μ l de ligase (4 U/ μ l)
- 4.92 μ l d'eau stérile.

Deux contrôles ont également été réalisés:

- un contrôle sans le vecteur pour déterminer la présence éventuelle d'un vecteur contaminant. La composition du milieu réactionnel est la suivante:

- 0 μ l de vecteur
- 1.66 μ l d'insert (à 10 ng par μ l)
- 1 μ l de tampon (10X)
- 1 μ l de ligase (4 U par μ l)
- 6.34 μ l d'eau

- un second contrôle est réalisé sans insert. Le milieu réactionnel contient:

- 1.42 μ l de vecteur
- 0 μ l d'insert
- 1 μ l de tampon
- 1 μ l de ligase
- 6.58 μ l d'eau stérile.

La ligation se fait à 14°C pendant une nuit, dans un bain thermostatisé ou dans un thermocycleur.

1.4.3. Transformation

La transformation se fait par électroporation en utilisant les bactéries fournies avec le plasmide, à savoir des XL1-Blue MRF'. Ces bactéries (Tet^R) ont préalablement été rendues électrocompétentes selon le protocole décrit dans Matériel et méthodes.

Quatre types de transformations ont été réalisés:

- a) 50 μ l de cellules + 10 μ l de produit de ligation
- b) 50 μ l de cellules + 10 μ l du produit de la réaction de ligation sans vecteur
- c) 50 μ l de cellules + 50 ng de plasmide natif
- d) 50 μ l de cellules + 10 μ l du produit de la réaction de ligation sans l'insert.

La transformation « a » constitue notre test. Les colonies positives obtenues sont repiquées et analysées ultérieurement. Les boîtes de pétri utilisées pour la culture contiennent de l'agarose, du X-gal (35µg/ml), de l'IPTG (35µg/ml), et sont Tet⁺ (50µg/ml) et Amp⁺ (60µg/ml). Les bactéries transformées avec le vecteur contenant l'insert apparaissent blanches car l'insertion de notre séquence d'intérêt disruptera lac Z.

La transformation « b » servira à l'établissement du contrôle de viabilité. On se rappelle que le vecteur est Amp^R, les bactéries contenant seulement l'insert ne sont donc pas résistantes à l'ampicilline. Deux boîtes Tet⁺ Amp⁻ sur lesquelles ont été étalés respectivement 5µl et 10 µl du produit de ligation de « b » sont réalisées. Ces boîtes constituent le contrôle de viabilité. De la même manière, deux boîtes de milieu agarose Tet⁺ Amp⁺ sont ensemencées: ce test permettra de démontrer l'absence de vecteur contaminant.

La transformation « c » constitue le contrôle positif (contrôle de transformation). Toutes les bactéries transformées apparaissent bleues sur les boîtes de milieu Tet⁺ Amp⁺ car elles possèdent uniquement le vecteur à l'état natif.

La transformation « d » ne devrait pas permettre d'obtenir de bactéries résistantes. Le vecteur restreint avec XhoI et XbaI ne peut pas se refermer car les deux sites de restriction sont incompatibles. Les seules bactéries éventuellement présentes seront celles transformées avec un vecteur n'ayant pas subi la restriction ou ayant subi une coupure à un seul site et qui s'est ensuite refermé. Les bactéries sont étalées sur milieu Tet⁺ Amp⁺.

1.4.3.1. Résultats qualitatifs

Les boîtes « transformation a » laissent apparaître un bon nombre de colonies bleues et blanches. Les colonies blanches sont repiquées et analysées ultérieurement. Le contrôle de viabilité s'est également avéré positif, alors que ces mêmes bactéries issues de la « transformation b », quand étalées sur milieu sélectif, ne forment aucune colonie. Les bactéries transformées avec le plasmide à l'état natif sont uniformément bleues conformément aux résultats attendus. Enfin, la transformation « d » ne laisse apparaître que quelques colonies sporadiques.

1.4.3.2. Efficiences de transformation

Pour 5 µl de bactéries déposées sur les boîtes « contrôle de viabilité »(b), on dénombre 1333 colonies. Dans la boîte « contrôle de transformation », on observe 986 colonies pour 200 µl. 2% des colonies sont transformées.

On obtient donc 985 colonies (transformation c) pour 10 ng de vecteur (1/5 des 50 ng de plasmide « natif »). On a 98500 cfu/µg soit environ 10⁵ cfu/µg.

1.4.4. Criblage des colonies repiquées

Suite à la transformation, 19 colonies ont été repiquées. Leur évaluation a été réalisée en utilisant des amorces externes à l'insert. Ces amorces universelles, Forward et Reverse, ont permis de mettre en évidence 3 colonies possédant des inserts correspondant à la taille

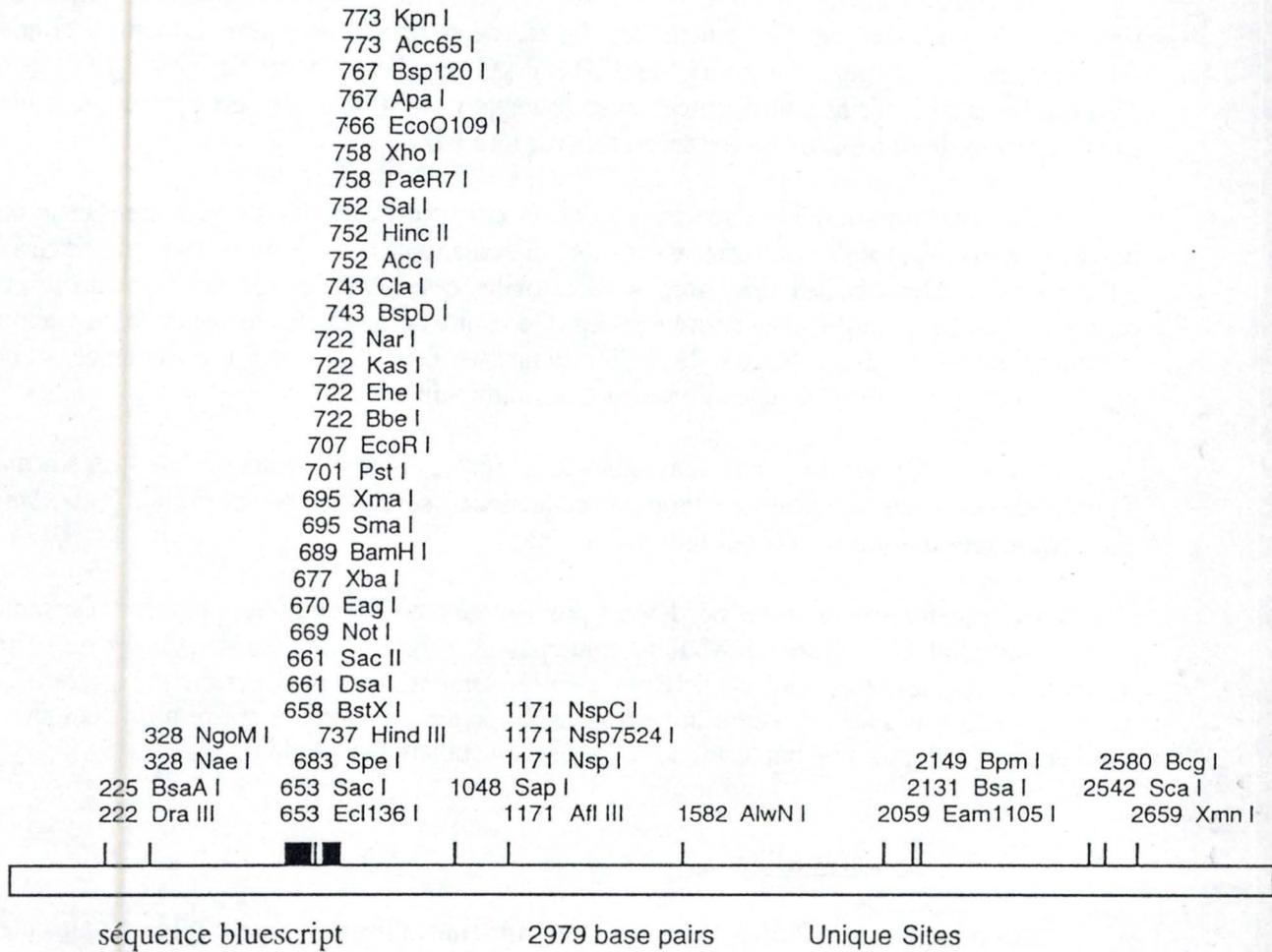


Figure 4.6: Représentation du site multiple de clonage de pBluescript II KS+

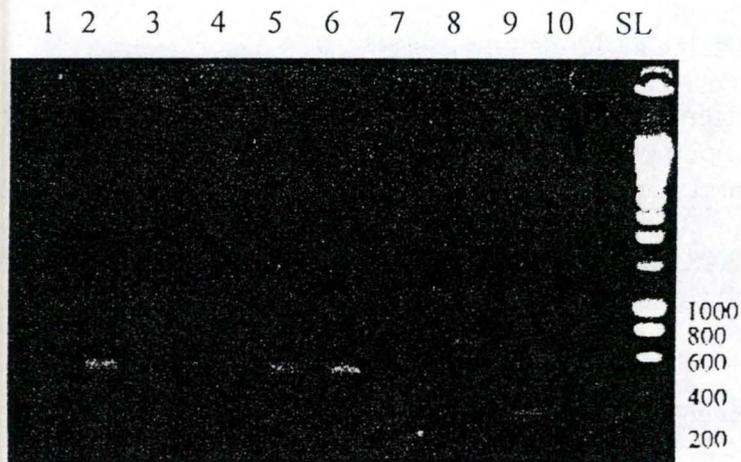


Figure 4.7: Gel d'évaluation des colonies transformantes.

attendue. On peut schématiser la construction plasmidique attendue comme illustré ci-après (voir aussi figure 4.6) :

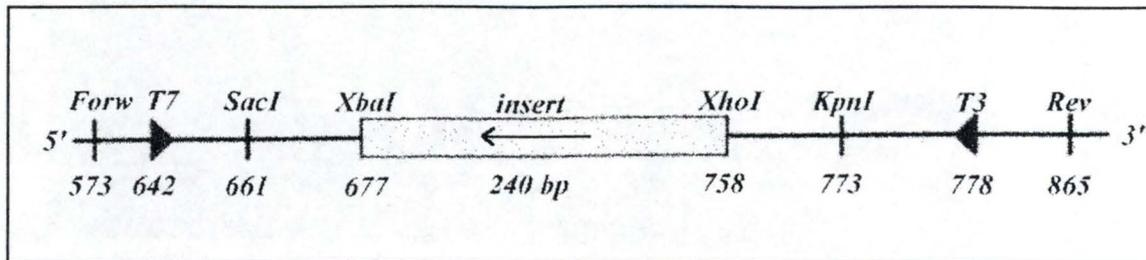


Figure 4.5: représentation de la construction plasmidique

Les fragments ont une taille attendue de l'ordre de 400 paires de bases. La figure 4.7 représente les résultats obtenus après migration sur gel d'agarose. Trois colonies intéressantes apparaissent, positionnées sur les pistes 2, 5 et 6. Ces pistes correspondent respectivement aux colonies n°4, n°9 et n°10.

Ces colonies ont fait l'objet d'un séquençage afin de connaître la nature exacte de l'amplicon inséré.

1.5. Séquençage des clones

Le séquençage de ces trois colonies nous a fourni une série de résultats sur base desquels il est apparu opportun de sous-cloner un clone déjà existant et caractérisé. Ce clone sera repris sous le numéro 22. Il a été obtenu d'une manière comparable à la nôtre par un chercheur du laboratoire travaillant sur le volet immunodétection des PME.

Il s'est avéré, suite au séquençage, que les clones 9 et 10 contiennent une séquence identique. Le clone n°4, quant à lui, est différent. Notre but étant de mettre en évidence les PME au niveau du méristème apical, un maximum de sondes différentes sont nécessaires. Le clone 22 présente une autre séquence que celle contenue dans 4 et 9. C'est pourquoi il a été décidé de le sous-cloner (voir Matériel et Méthode) car il se trouvait dans un vecteur incompatible avec nos recherches. Ce clonage nous a permis de mettre en pratique la technique de transformation par choc thermique. Les cellules utilisées dans le cadre de cette transformation sont des Top10F' fournies dans le kit de transformation « One Shot » (Invitrogen). On montre en figure 4.7 le gel d'évaluation après amplification des clones potentiellement intéressants avec les amorces Forward et Reverse. Seuls les clones 21 et 28 présentent un profil de migration inattendu. Le clone 22 a été utilisé pour la production de la sonde.

Le séquençage a été mené en parallèle au départ des sites d'hybridation des amorces universelles Forward et Reverse, ce qui nous a fourni la séquence du brin sens et de son complémentaire.

Les séquences obtenues sont illustrées ci-dessous. Sont présentées en premier lieu les séquences en bases et ensuite leur conversion en acides aminés. Les régions conservées sont soulignées. Les sites de restrictions présents dans les amorces, ainsi que les ajouts de part et d'autre de ces sites, ont été retirés pour la présentation de ces résultats.

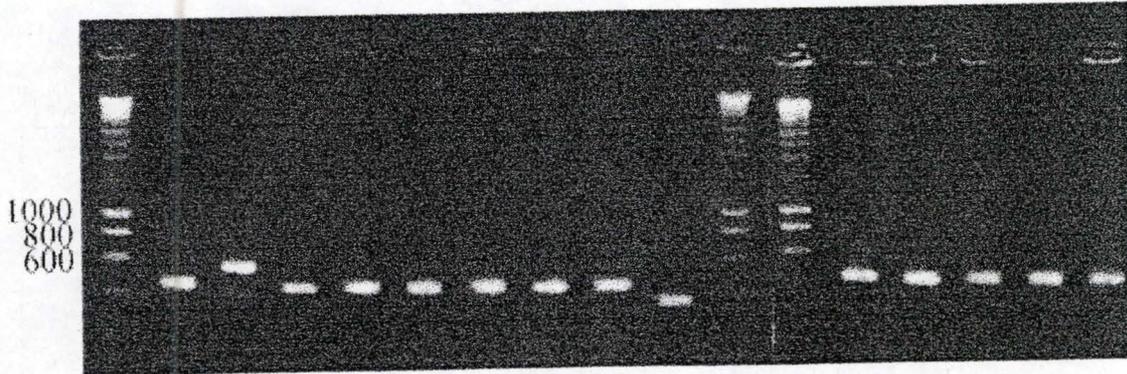


Figure 4.8: Gel d'évaluation du sous-clonage.

| | | | |
|-----------|-----|---|---|
| 9rev | 1 | GGGACAGTAGACTTCATTTTCGGAAACGCGCCGTCGTA | CTCCAAGACTGCGACATC |
| 22rev | 1 | GGGACTGTAGACTTCATCTTCGGAAAGCGCCGCGGTGGGGTCCAAGACTGCAAGATC | |
| 4rev | 1 | GGTACTGTGACTTCATCTTCGGAAAATCCGCGACAGT | GATCCAAA |
| consensus | 1 | GG AC GT GACTTCAT TTCGGAAa CCGC g G a TCCA | AgACT ATC |
| | | | |
| 9rev | 61 | CACGCTCGCCGACCAAAC | TCCGGC--CAGAAAAACATGGT |
| 22rev | 61 | ATGCCACGTCAGCC--TCTTGGGAAACAGTTCAACACCATAACAGCTCAGGGGAAGAAA | |
| 4rev | 61 | CTCATCCGAAAGGGTAGCGAGGGA-CAAGCCC | ACTACGTTACAGCCGACGGTAACGAGA |
| consensus | 61 | CG ga C GG CAg AC gT AC GC A GG a GA | |
| | | | |
| 9rev | 118 | GACCC | TACCAG-AACACGGGGATAGTTATCCAGAACTGTCGGATCGGTGCCACGTCGG |
| 22rev | 118 | GATCCGAACCAG--AACTCCGGCATGTCGATCCAGCGATGCACTATCTCCGCCA-ACGG | |
| 4rev | 119 | AAGGTGCAGCGGTC | AAGATCGGTATTGTTCTTCAGAACTGCCGTATCATGGCGG-ACAA |
| consensus | 121 | gA A CaG AA GG AT T CAG a TG ATC GC a Cgg | |
| | | | |
| 9rev | 176 | ATTTAATGTCGGTGAAAAGTAGTTTTTCCAA--CGTACCTTGGCCGCCCTTGGAAG | |
| 22rev | 174 | G---AATGTGACCGC-----TCCGA--CGTACCTTGGACGCCCTTGGAAG | |
| 4rev | 177 | AGACCTCGAAGCTGACAAGCTAACAGCAAATCGTACCTGGGCCGCCCTTGGAAG | |
| consensus | 181 | a G g G CaA CGTACCT GG CGCC TGGAAG | |
| | | | |
| 4rev | 1 | GTVD | FIFGKSATVIQNSLILIRKQSEGQAHYVTADGNEKGAAVKIGIVLQNCRIMADKD |
| 9rev | 1 | GTVD | FIFGNAAVVLQCDIHARRPNSGQKNMVTAGRTD-PNQNTGIVIQNCRIGATSD |
| 22rev | 1 | GTVD | FIFGSAAVGVQDCKIMPRQPLGKQFNTITAQKKD-PNQNSGMSIQRCTISANG- |
| consensus | 1 | GTVD | FIFG A iQ I R Q vTA G Gi lQ C I A |
| | | | |
| 4rev | 61 | LEADKLT | SKSYLGRPWK |
| 9rev | 60 | LMSVKSS | FPTYLGRPWK |
| 22rev | 59 | ----NVTAPT | LYLGRPWK |
| consensus | 61 | t s | YLGRPWK |

Figure 4.9: Alignement des séquences SaPME4 (4 rev), SaPME3 (9rev) et SaPME1-2 (22 rev).

4 Reverse (228 bp)

GGTACTGTGCGACTTCATCTTCGGAAAATCCGCGACAGTGATCCAAAACCTCTCTAATCCTCATCCGA
AAGGGTAGCGAGGGACAAGCCCACTACGTTACAGCCGACGGTAACGAGAAAGGTGCAGCGGTCA
AGATCGGTATTGTTCTTCAGAACTGCCGTATCATGGCGGACAAAGACCTCGAAGCTGACAAGCTAA
CCAGCAAATCGTACCTGGGCCGCCCTTGAAG

9 Reverse (225 bp)

GGGACAGTAGACTTCATTTTTCGGAAACGCCGCCGTCGTACTCCAAGACTGCGACATCCACGCTCGC
CGACCAAACCTCCGGCCAGAAAAACATGGTCACCGCCCAAGGACGGACTGACCCTAACCAGAACAC
GGGGATAGTTATCCAGAACTGTCCGATCGGTGCCACGTCGGATTTAATGTCGGTGAAAAGTAGTTT
TCCAACGTACCTTGGGCCGCCCTTGAAG

22 Reverse (210 bp)

GGGACTGTAGACTTCATCTTCGGAAAGCGCCGCGGtGGGGTCCAAGACTGCAAGATCATGCCACGT
CAGCCTCTTGGGAAACAGTTCAACACCATAACAGCTCAGGGGAAGAAAGATCCGAACCAGAACTC
CGGCATGTCGATCCAGCGATGCACTATCTCCGCCAACGGGAATGTGACCGCTCCGACGTACCTTGG
ACGCCCTTGAAG

4 Reverse a.a.

GTVDFIGKSATVIQNSLILIRKGSEGQAHYVTADGNEKGAAVKIGIVLQNCRIMADKDLEADKLTSSY
LGRPWK

9 Reverse a.a.

GTVDFIGNAAVVLQDCDIHARRPNSGQKNMVTAQGRTPNQNTGIVIQNCRIGATSDLMSVKSSFTY
LGRPWK

22 Reverse a.a.

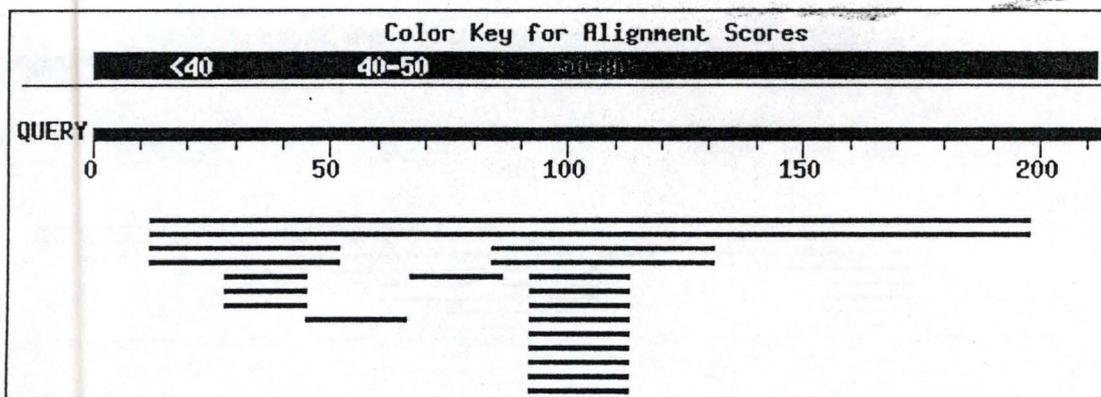
GTVDFIGSAAVGVQDCKIMPRQPLGKQFNITTAQGKKDPNQNSGMSIQRCTISANGNVTAPTYLGRP
W

Un alignement de ces différentes séquences l'une par rapport à l'autre est présenté en figure 4.9.

L'orientation codante 5'- 3' est obtenue au départ de Reverse. Conformément à la figure 4.5, c'est donc bien au départ du promoteur T7 que la sonde antisens sera synthétisée. Cette information nous a permis de confirmer la polarité de l'insert telle que précédemment illustrée en figure 4.5.

Les régions conservées, précédemment mises en évidence dans la littérature, se retrouvent également chez *Sinapis*, conformément à nos prévisions. Notre option s'est donc avérée payante.

La nature des séquences 4 et 9 clonées a ensuite été analysée. Pour ce faire, les résultats du séquençage ont été introduits dans un système (Blast) permettant de déterminer les séquences publiées présentant le plus grand degré d'identité avec nos résultats. Les figures 4.10 à 4.12 illustrent les conclusions obtenues.



| Sequences producing significant alignments: | Score (bits) | E Value |
|--|--------------|---------|
| gb U25649 ATU25649 Arabidopsis thaliana putative pectin methyle... | 125 | 4e-27 |
| emb X81585 ATPME1 A.thaliana mRNA for pectin methylesterase | 125 | 4e-27 |
| emb X68028 PVPVE3 P.vulgaris PVPVE3 mRNA for pectin esterase | 64 | 1e-08 |
| emb X85216 PVRNAPE P.vulgaris mRNA for pectinesterase | 64 | 1e-08 |
| dbj AB022220.1 AB022220 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chrom... | 42 | 0.044 |
| gb AF033204 AF033204 Arabidopsis thaliana putative pectin methy... | 42 | 0.044 |
| dbj AP000085.1 AP000085 Homo sapiens genomic DNA of 21q22.1, AP... | 40 | 0.17 |
| gb AF091019 AF091019 Tick-borne encephalitis virus strain T-blo... | 36 | 2.7 |
| ref NM_003749.1 IRS2 Homo sapiens insulin receptor substrate 2... | 36 | 2.7 |
| gb U27491 TEU27491 Tick-borne encephalitis virus 263 polyprotei... | 36 | 2.7 |
| gb AC002519 HUAC002519 Human Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A... | 36 | 2.7 |
| emb X07755 TBEV1 Tick-borne encephalitis virus genes for protei... | 36 | 2.7 |
| dbj AB000732 AB000732 Homo sapiens gene for insulin receptor su... | 36 | 2.7 |
| gb AF091016 AF091016 Tick-borne encephalitis virus strain RK142... | 36 | 2.7 |
| dbj AB001026 AB001026 Tick-borne encephalitis virus genomic RNA... | 36 | 2.7 |
| emb X03870 TOTBEV1 Tick-borne encephalitis virus (TBEV, strain ... | 36 | 2.7 |
| gb AF091008 AF091008 Tick-borne encephalitis virus strain Crime... | 36 | 2.7 |
| gb M38310 TBESP Tick-borne encephalitis virus structural protei... | 36 | 2.7 |
| gb AF091013 AF091013 Tick-borne encephalitis virus strain N132 ... | 36 | 2.7 |
| gb AF073310.1 AF073310 Homo sapiens insulin receptor substrate-... | 36 | 2.7 |

[gb|U25649|ATU25649](#) Arabidopsis thaliana putative pectin methylesterase (ATPME2) gene, partial cds, and (ATPME1) gene, complete cds
Length = 5873

Query: 13 gacttcatcttcggaagcgcgcggtgggggtccaagactgcaagatcatgccacgtcag 72
||||||| ||||| || ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 4407 gacttcattttcggagtgctgcggtcgttttccaaggctgcaaaatcatgcctcgccag 4466

Query: 73 cctcttgggaaacagttcaacaccataacagctcaggggaagaaagatccgaaccagaac 132
||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 4467 cctctttctaaccaattcaacaccataaccgctcagggcaaaaagatccgaaccaaagc 4526

Query: 133 tccggcatgtcgatccagcgatgcactatctccgccaacgggaatgtgaccgctccgacg 192
|| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 4527 tcgggatgtcgattcaacgatgcactatctccgcaaacggcaatgtgattgctcccacg 4586

Query: 193 taccttg 199
|| ||||
Sbjct: 4587 tatcttg 4593

Figure 4.12: Résultats du Blast de clone 22

Il s'avère que la colonie numéro 4 contient un insert possédant un très haut degré d'identité avec la séquence publiée de *Brassica napus*: Bp19. Pour rappel, Bp19 est une PME spécifiquement exprimée dans le pollen au cours de sa formation. *Brassica napus* est, comme *Sinapis alba*, une plante de la famille des crucifères, ce qui explique sans doute cette ressemblance. La séquence contenue dans le clone 4 ressemble également à une PME « flower specific » d'*Arabidopsis thaliana*: AtPME4. Pour cette raison, nous nommerons ce clone SaPME4. Le détail de l'alignement avec ces deux séquences apparaît en figure 4.10.

La colonie numéro 9 contient un fragment d'amplification présentant un très haut degré d'identité avec une PME d'*Arabidopsis thaliana*: AtPME3. Nous l'appellerons SaPME3. Le détail de l'alignement avec cette séquences apparaît en figure 4.11.

Parmi les séquences de PME connues chez *Arabidopsis*, seules 4 ont actuellement été séquencées entièrement parmi les 12 qui ont été identifiées. Dans ces 4 séquences se retrouvent: AtPME4, AtPME3 ainsi que AtPME1 et AtPME2. Les deux premiers clones dont nous disposons ne nous ont fourni des séquences ne présentant un haut degré d'identité qu'avec AtPME3 et AtPME4 (figure 4.12). Etant donné le fait que de nombreuses PME sont exprimées de façon différentielle au cours de la croissance, il est probable que ces deux séquences ne puissent nous donner un marquage global des PME présentes dans le méristème au cours du passage à l'état floral. C'est pourquoi nous avons sous-cloné la colonie 22 dans notre vecteur (pBluescript II KS+).

En effet, la séquence contenue dans le clone 22 présente un fort degré d'identité avec AtPME1 et AtPME2. Il est intéressant de signaler que ces deux PME sont localisées en tandem dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Ce clone a été nommé SaPME1-2.

Les matrices pour la production des sondes sont maintenant disponibles. L'hybridation *in situ* peut avoir lieu.

2. Synthèse des sondes ARN ³⁵S radioactives

La synthèse des sondes demande une étape préalable de linéarisation de la matrice. Cette linéarisation se fera via une restriction avec une enzyme coupant une seule fois dans le site multiple de clonage. L'enzyme choisie devra couper à l'extérieur de l'insert, à l'opposé du promoteur à partir duquel on veut réaliser la transcription et en une position antérieure au promoteur se trouvant de l'autre côté de l'insert.

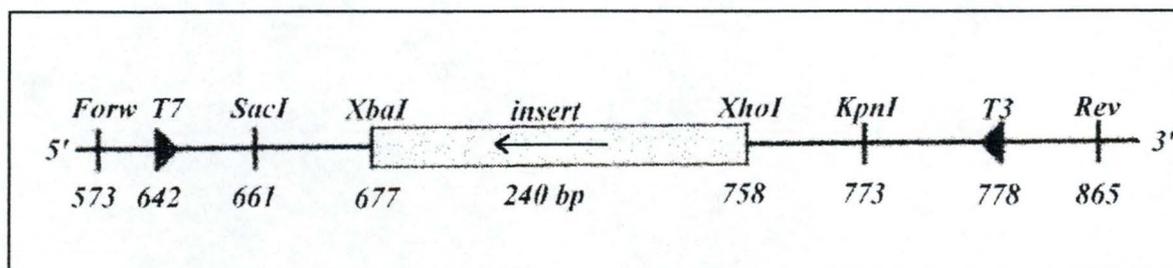


Figure 4.13: Représentation de la construction plasmidique

Ainsi, pour pouvoir réaliser la transcription *in vitro* au départ de T3 (sonde sens identique au messenger), nous avons choisi de linéariser le vecteur par une restriction avec *SacI*.

KpnI, quant à elle, permettra la linéarisation nécessaire à la synthèse de la sonde antisens (complémentaire au messenger) à partir de T7.

La transcription *in vitro* se fait grâce au kit Megascript (Ambion). Au cours de ce mémoire, l'expérience d'hybridation *in situ* a été réalisée à trois reprises.

Cette technique étant encore à mettre au point dans notre laboratoire, une première expérience a été menée avec une sonde fournie par le département de physiologie végétale de l'Université de Liège (Dr. Jacquemart). Les résultats obtenus par ce département ont fait l'objet d'une publication en 1997 (Bonhomme *et al.*, 1997). Cette sonde permet de mettre en évidence la transcription du gène SaMADS D, un gène de *Sinapis alba*, intervenant dans la détermination de l'identité du méristème inflorescentiel et qui interagirait avec des gènes d'identité des organes floraux. Des tests menés sur des méristèmes V et I prélevés 96 heures après le début du jour long devraient, conformément aux résultats publiés, nous permettre de voir apparaître un signal, si l'expérience est correctement réalisée.

Après cette étape de familiarisation avec la technique, nous sommes passés aux tests proprement dits en réalisant deux fois la manipulation en modifiant quelque peu certains paramètres d'une expérience à l'autre. Ces différentes modifications ont été réalisées en se basant sur les résultats obtenus lors de l'étape de test avec la sonde SaMADS D. Les changements effectués se sont appliqués d'une part, à l'obtention d'un signal (en jouant sur les conditions d'hybridation) et, d'autre part, à tenter de rendre ce signal le plus spécifique possible en modifiant les paramètres intervenant dans l'élimination des hybrides non spécifiques.

2.1. Résultats des différentes transcriptions

Une série de comptages de la radioactivité des sondes produites a été réalisée suivant le protocole décrit dans Matériel et méthodes. Ceux-ci permettent de calculer le pourcentage d'incorporation, le poids de la sonde, le volume de TED dans lequel le produit de transcription devra être resuspendu afin d'obtenir une concentration finale en sondes de 0.3 ng par μl .

Le calcul du pourcentage d'incorporation nécessite la quantification de la radioactivité contenue dans les sondes et de celle contenue dans les surnageants. La formule suivante permet cette quantification:

$$\text{nbr de cpm comptés dans } 1 \mu\text{l} \times \text{volume total} = \text{nbr de cpm dans le volume total}$$

Le pourcentage d'incorporation est calculé en faisant le rapport de la radioactivité de la sonde sur la radioactivité totale (sonde + surnageant) et en multipliant le tout par 100.

$$\frac{\text{radioactivité de la sonde}}{(\text{rad. sonde} + \text{rad. surn.})} \times 100$$

Le masse totale de sonde produite est calculée via la formule:

$$(\text{pourcentage d'inc./100}) \times [] \text{ en nucléotides (moles}/\mu\text{l}) \times \text{vol. de la réaction } (\mu\text{l}) \times 4 \times 375 \cdot 10^5 \text{ } (\mu\text{g/mole})$$

La concentration en nucléotides marqués est la concentration en nucléotides limitante ($50 \cdot 10^{-11}$), 4 est le nombre de nucléotides et $375 \cdot 10^6$ est le poids d'un nucléotide (en $\mu\text{g}/\text{mole}$).

On met 0.15 μg de sondes pour 500 μl de milieu d'hybridation; on pourra déterminer le nombre de cpm présents dans les 20 μl de milieu d'hybridation qui seront déposés sur une lame.

Deux séries de réactions de transcription ont été réalisées. La première est destinée à la synthèse de la sonde témoin SaMADS D et la seconde affectée à la synthèse de nos différentes sondes PME.

2.1.1. Transcription SaMADS D

Une transcription au départ de T3 et une au départ de T7 ont été effectuées. La matrice nous a été fournie, sous forme d'un plasmide (pBluescript II KS+), par le département de Physiologie Végétale de l'Université de Liège. Cette matrice a été linéarisée via une restriction par HindIII pour la synthèse de la sonde antisens au départ du promoteur T7. Une restriction par XbaI a permis la production de la sonde sens au départ du promoteur T3. Les comptages réalisés sur la solution de sondes seront repris dans le tableau récapitulatif sous la dénomination T3 et T7. Les surnageants seront désignés sous l'appellation ST3 et ST7.

| | cpm/ μl | volume total | radioactivité totale |
|--------|--------------------|--------------|----------------------|
| ST7 AS | 431117 | 110 | 47422870 |
| T7 AS | 667588 | 55 | 36717374 |
| ST3 S | 559675 | 110 | 61564250 |
| T3 S | 118946 | 55 | 6542030 |

Incorporation T7: $(36717340 / (36717374 + 47422870)) \times 100 = 43.6 \%$

Incorporation T3: $(6542030 / (61564250 + 6542030)) \times 100 = 9.6 \%$

L'évidente hétérogénéité entre ces deux résultats semble provenir d'un problème de remise en suspension des sondes après l'étape de précipitation et de resuspension dans le TED. En effet, le pourcentage d'incorporation de T7 avait une première fois été mesuré et les calculs fournissaient une incorporation de 26 %. Après une seconde étape de remise en suspension, on passe à 43%. Ce second comptage n'a pas été réalisé pour T3. L'estimation du pourcentage d'incorporation de T7 sera basé sur la moyenne des deux pourcentages obtenus, ce qui fournit une valeur de 34.8 % d'incorporation.

Le calcul de la quantité de sonde produite se fait via la formule suivante:

$$\text{(pourcentage d'incorporation/100)} \times 5 \cdot 10^{-11} \times 20 \times 4 \times 375 \cdot 10^6$$

$$\text{- T3} = 0.096 \times 5 \cdot 10^{-11} \times 20 \times 4 \times 375 \cdot 10^6 = 0.144 \mu\text{g de sonde}$$

$$\text{- T7} = 0.348 \times 5 \cdot 10^{-11} \times 20 \times 4 \times 375 \cdot 10^6 = 0.522 \mu\text{g de sonde}$$

Volume de remise en suspension des sondes pour obtenir une concentration finale de 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

$$\text{-T3 (sens)} = 0.144 / 0.03 = 4.8 \mu\text{l de TED}$$

$$\text{-T7 (antisens)} = 0.522 / 0.03 = 17.4 \mu\text{l de TED.}$$

Sachant qu'on pose 0.2µl de sonde sur chacune des lames, le nombre de cpm déposé sur chaque lame est:

- T3 = (6542030 / 4.8) x 0.2 = 397 10³ cpm
- T7 = (36717374 / 17.4) x 0.2 = 422 10³ cpm.

Nous devons réduire la taille de la sonde pour favoriser son accès à la cible. Sa taille actuelle est de 650 bp; nous désirons la réduire à 150 bp. Sur base de la formule présentée ci-avant, on estime la durée à 46 minutes.

$$t = (0.650 - 0.150) / (0.11 \times 0.650 \times 0.150) = 46 \text{ minutes}$$

2.1.2. Transcription des sondes SaPME1-2, SaPME3 et SaPME4

Les résultats des comptages sont présentés dans le tableau récapitulatif se trouvant ci-dessous.

| | cpm/µl | volume total | radioactivité totale |
|-----------------|---------|--------------|----------------------|
| SaPME4 ST3 S | 329580 | 650 | 214227000 |
| SaPME4 T3 S | 1326480 | 55 | 72956400 |
| SaPME4 ST7 AS | 193760 | 650 | 125944000 |
| SaPME4 T7 AS | 755020 | 55 | 41526100 |
| SaPME3 ST3 S | 241993 | 650 | 157236950 |
| SaPME3 T3 S | 1417190 | 55 | 77945450 |
| SaPME3 ST7 AS | 112749 | 650 | 73286850 |
| SaPME3 T7 AS | 1178050 | 55 | 64792750 |
| SaPME1-2 ST3 S | 221013 | 650 | 143658450 |
| SaPME1-2 T3 S | 733790 | 55 | 40358450 |
| SaPME1-2 ST7 AS | 175 | 650 | 70621600 |
| SaPME1-2 T7 AS | 1261100 | 55 | 70621600 |

| | Quantité de sonde produite | Volume de TED à rajouter |
|----------------|----------------------------|--------------------------|
| SaPME4 T3 S | 0.3750 µg | 12.50 µl |
| SaPME4 T7 AS | 0.3750 µg | 12.50 µl |
| SaPME3 T3 S | 0.4965 µg | 16.50 µl |
| SaPME3 T7 AS | 0.7035 µg | 23.45 µl |
| SaPME1-2 T3 S | 0.3280 µg | 10.93 µl |
| SaPME1-2 T7 AS | 1.5000 µg | 20.00 µl |

- Incorporation SaPME4 T3 S : (72956400 / (72956400 + 214227000)) x 100 = 25 %
- Incorporation SaPME4 T7 AS : (41526100 / (41526100 + 125944000)) x 100 = 24.78%
- Incorporation SaPME3 T3 S : (77945450 / (77945450 + 157236950)) x 100 = 33.1 %
- Incorporation SaPME3 T7 AS : (64792750 / (64792750 + 73286850)) x 100 = 46.9 %
- Incorporation SaPME1-2 T3 S : (40358450 / (40358450 + 143658450)) x 100 = 21.9 %
- Incorporation SaPME1-2 T7 AS : (70621600 / (70621600 + 118300)) x 100 = 99.8 %

Le pourcentage d'incorporation calculé pour SaPME1-2 T7 paraissant fantaisiste (probablement causé par une mauvaise resuspension de la sonde due à un séchage trop

important ou à des étapes de centrifugation trop longues) par rapport à ceux calculés pour le reste de cette transcription, nous avons décidé de recalculer ce dernier pourcentage d'incorporation sur base de la moyenne des pourcentages obtenus pour les transcriptions au départ de T7 des sondes SaPME4 et SaPME3.

- pourcentage d'incorporation estimé de SaPME1-2 T7: $(24.78+46.9)/2 = 35.84 \%$
- quantité de sonde produite: $0.358 \times 5 \times 10^{-11} \times 20 \times 4 \times 375 \times 10^6 = 0.537 \mu\text{g}$
- volume de remise en suspension: $(0.537/0.03) = 17.9\mu\text{l}$

| | cpm totaux | volume de remise en suspension | cpm/ μl |
|----------------|------------|--------------------------------|--------------------|
| SaPME4 T3 S | 72956400 | 12.5 | 5836512 |
| SaPME4 T7 AS | 41526100 | 12.5 | 3322088 |
| SaPME3 T3 S | 77945450 | 16.5 | 4723967 |
| SaPME3 T7 AS | 64792750 | 23.45 | 2763017 |
| SaPME1-2 T3 S | 40358450 | 10.93 | 3692447 |
| SaPME1-2 T7 AS | 70621600 | 17.90 | 3945340 |

Lors du premier test d'hybridation, nous avons remplacé les 0.2 μl de sonde initialement prévus pour chaque lame par 3 x 0.1 μl de chacune de nos sondes. Cette modification a été appliquée aux lames V/I 12, 16 et 20, aussi bien avec la sonde sens que la sonde antisens. Les quantités sont restées identiques à celles précisées dans la Matériel et méthodes en ce qui concerne le test positif réalisé avec SaMADS D.

Nous avons donc déposé, sur chaque lame, lors du premier test PME:

$$\begin{aligned} \text{Lames antisens: } & 0.1 (3322088) + 0.1 (2763017) + 0.1 (3945340) = 1003 \times 10^3 \text{ cpm/lame} \\ \text{Lames sens: } & 0.1 (5836512) + 0.1 (4723967) + 0.1 (3692447) = 1425 \times 10^3 \text{ cpm/lame} \end{aligned}$$

Lors du second test PME, nous avons augmenté la quantité de chaque type de sonde de 0.1 μl à 0.15 μl par lame, ce qui nous donne les chiffres suivants:

$$\begin{aligned} \text{Lames antisens: } & 0.15 (3322088) + 0.15 (2763017) + 0.15 (3945340) = 1504 \times 10^3 \text{ cpm/lame} \\ \text{Lames sens : } & 0.15 (5836512) + 0.15 (4723967) + 0.15 (3692447) = 2137 \times 10^3 \text{ cpm/lame} \end{aligned}$$

Nous avons fait le choix d'utiliser un mélange de sonde, suite à l'analyse de la littérature. Le but de cette étude est tout d'abord de pouvoir mettre en évidence des PME au niveau du méristème et ensuite tenter de montrer une éventuelle modification de leur expression. La littérature nous apprend que les PME sont des enzymes ubiquistes: on les retrouve tout au long de la vie de la plante et dans tous les types de tissus (Albani *et al.*, 1991, Turner *et al.*, 1996, Gaffe *et al.*, 1994, Guglielmino *et al.*, 1997). Cependant, alors que certaines des isoformes exprimées dans une plante sont constantes au cours du temps, d'autres ont une expression localisée aussi bien au niveau de leur période d'expression que de leur localisation (Gaffe *et al.*, 1994, Albani *et al.*, 1991, Guglielmino *et al.*, 1997). Nos sondes étant obtenues par amplification sur une matrice DNA génomique, et non de cDNA extrait du méristème au cours de la transition florale, il nous est difficile de savoir si les séquences contre lesquelles nos sondes sont dirigées sont effectivement transcrites au cours du passage à la floraison: l'utilisation d'un mélange de sondes permet de restreindre la probabilité que nos sondes soient dirigées contre des séquences non exprimées au moment du prélèvement.

En nous basant sur la formule, le temps nécessaire à la réduction de la taille de la sonde de 300 pb vers 150 pb via hydrolyse carbonate est de:

$$t = (0.300 - 0.150) / (0.11 \times 0.300 \times 0.150) = 30 \text{ minutes.}$$

3. Résultats des tests d'hybridation

Comme nous l'avons dit précédemment, trois séries d'hybridation ont été réalisées: une première avec la sonde SaMADS D, sonde efficace puisque ayant été publiée, et deux autres séries avec notre mélange des trois sondes (SaPME1-2, SaPME3 et SaPME4). Dans ces 2 dernières séries, un contrôle positif a été réalisé en hybridant des échantillons prélevés à la 96^{ème} heure avec la sonde SaMADS D.

Nous avons décidé d'analyser différents temps au cours de la même expérience: de cette manière, il nous sera possible de comparer d'éventuels résultats car ceux-ci auront été obtenus dans des conditions rigoureusement identiques.

Le choix des temps 12, 16 et 20, pour les tests PME, s'est fait au regard des résultats obtenus par S. Sobry lors de son mémoire de Licence (1997). Ce mémoire était notamment consacré à l'étude des modifications du contenu en pectine au niveau du méristème via détection immunologique. L'anticorps monoclonal utilisé, dirigé contre les pectines dans leur conformation en boîte à oeufs, est celui développé par F. Liners au cours de sa Thèse de doctorat. Celui-ci, ayant permis de nombreuses publications; il se posait comme un outil de choix pour la détection des modifications du contenu en pectines.

Les résultats obtenus au cours de ce mémoire, ont permis de mettre en évidence une diminution du contenu en pectines au niveau du méristème. Cette diminution s'observe entre la douzième et la vingtième heure après le début du jour long. Ces résultats nous ont donc tout naturellement poussés à nous focaliser sur les échantillons prélevés 12, 16 et 20 heures après le début du jour expérimental.

Pour chaque expérience, nous avons analysé les temps V12, I12, V16, I16, V20 et I20. Les lettres V et I permettent de distinguer les échantillons issus de plantes végétatives (V) ou induites (I). Les chiffres 12, 16 et 20 correspondent au moment auquel l'objet analysé a été prélevé, à savoir 12, 16 ou 20 heures après le début du jour long.

Un microscope à fond noir et éclairage U.V. a été nécessaire pour la réalisation des images qui vont suivre. La fluorescence fera apparaître la coloration bleue conférée aux tissus par le calcofluor alors que le fond noir fera apparaître les grains d'argent réduit qui indiquent la localisation du marquage.

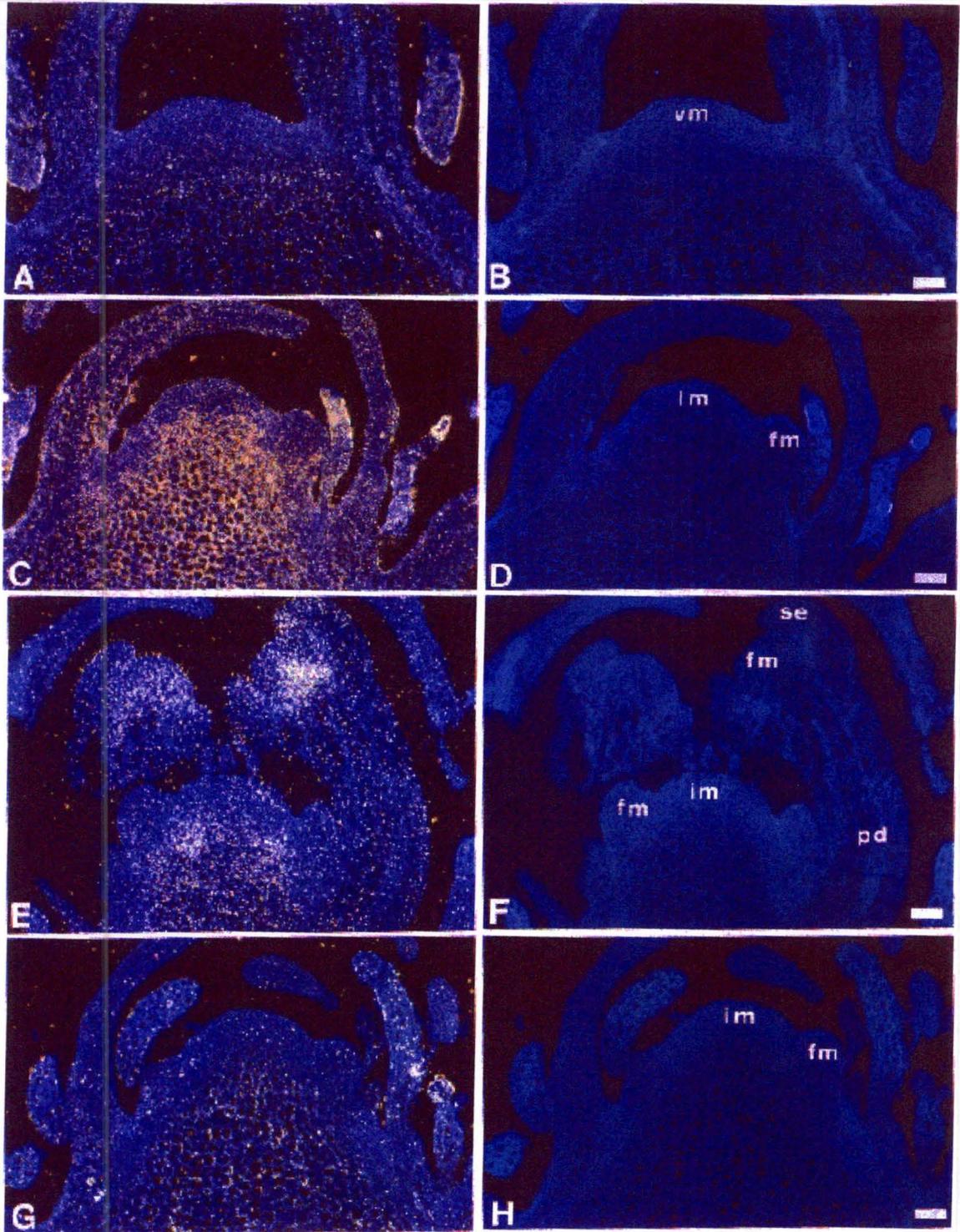


Figure 4.14: Résultats publiés avec la sonde SaMADS D. Légende: *fm*/méristème floral, *im*/méristème inflorescentiel, *pd*/pedicèle, *se*/sécales, *vm*/méristème végétatif.

3.1. Test SaMADS D

Les temps d'exposition publiés variant de quelques jours (Christensens *et al.*, 1998) à plusieurs semaines (Bonhomme *et al.*, 1997), nous avons décidé de répartir les lames en différentes séries et d'espacer de 7 jours la révélation d'une série par rapport à la suivante.

Les hybridations se font sur des objets prélevés 96 heures après le début du jour long. Le 96^{ème} heure correspond à un stade intermédiaire entre l'image C et l'image E de la figure 4.14. Le marquage doit s'observer à la base du méristème inflorescentiel et à l'extérieur des régions du méristème floral destiné à former des fleurs.

Pour ce premier test, différentes séries de lames sont réalisées au départ des objets issus de plantes maintenues en condition de croissance végétative (V96) et d'autres avec des objets provenant de plantes exposées au jour long (I96). On divise chaque série en plusieurs groupes: chacun des groupes sera hybridé avec une quantité différente de sondes afin de déterminer la concentration en sonde qui fournit les meilleurs résultats. Pour ces tests, la sonde antisens sera diluée 1X, 2X, 4X ou 8X. Cette sonde antisens est produite au départ du promoteur T7 après linéarisation du vecteur par une digestion avec l'enzyme de restriction HindIII. Les sondes sens seront utilisées pour réaliser des contrôles négatifs.

Ce n'est qu'au début de la troisième semaine après la pose de l'émulsion que nous avons commencé à voir apparaître les grains d'argent réduit. Dans les semaines qui ont suivi, et à mesure que l'exposition s'intensifiait, on a pu constater qu'il ne nous était pas possible de faire de différence entre le bruit de fond et un éventuel marquage spécifique semblable à celui illustré dans l'article de Bonhomme *et al.*, (1997) (figure 4.14). De plus, certaines lames présentaient beaucoup de marquage et d'autres pas.

Ces premiers résultats ayant été obtenus avant le début des tests avec nos sondes, nous avons procédé à certaines modifications du protocole de base en vue d'optimiser le rapport bruit de fond / signal.

La réduction du bruit de fond est en grande partie réalisée par des traitements post-hybridation visant à éliminer les sondes simple brin non hybridées, en particulier par le traitement à la Rnase A. Nous avons décidé d'ajouter au bain de Rnase A de la Rnase T1 (2µl à 100.000 U/ml) conformément aux informations publiées par Angerer *et al.* (1987). Cette Rnase ayant une spécificité de coupure différente de la Rnase A, on réduit de cette façon le nombre de sondes suffisamment grandes pour rester sur la coupe après les étapes de lavage.

Lors de ce premier test, nous avons constaté que les couvre-objet 22/22 mm présentaient un problème d'adhérence à la lame, et que ceux-ci, se détachant parfois, ne maintenaient plus la sonde sur l'objet. Ce point peut en partie expliquer l'absence de signal significatif sur certaines lames. Nous avons donc décidé d'utiliser des couvre-objet 24/36 mm au lieu des 22/22 mm utilisés précédemment. Ceux-ci présentent l'avantage de ne pas découvrir les objets au cas où ils viendraient à glisser; leur adhérence était, de plus, supérieure à celle observée avec les couvre-objet 22/22 mm.

Il s'est également avéré que lors de cette première expérience, nous avons omis l'étape de dénaturation de la sonde avant hybridation. Nous avons veillé à ne plus commettre cette erreur par la suite.

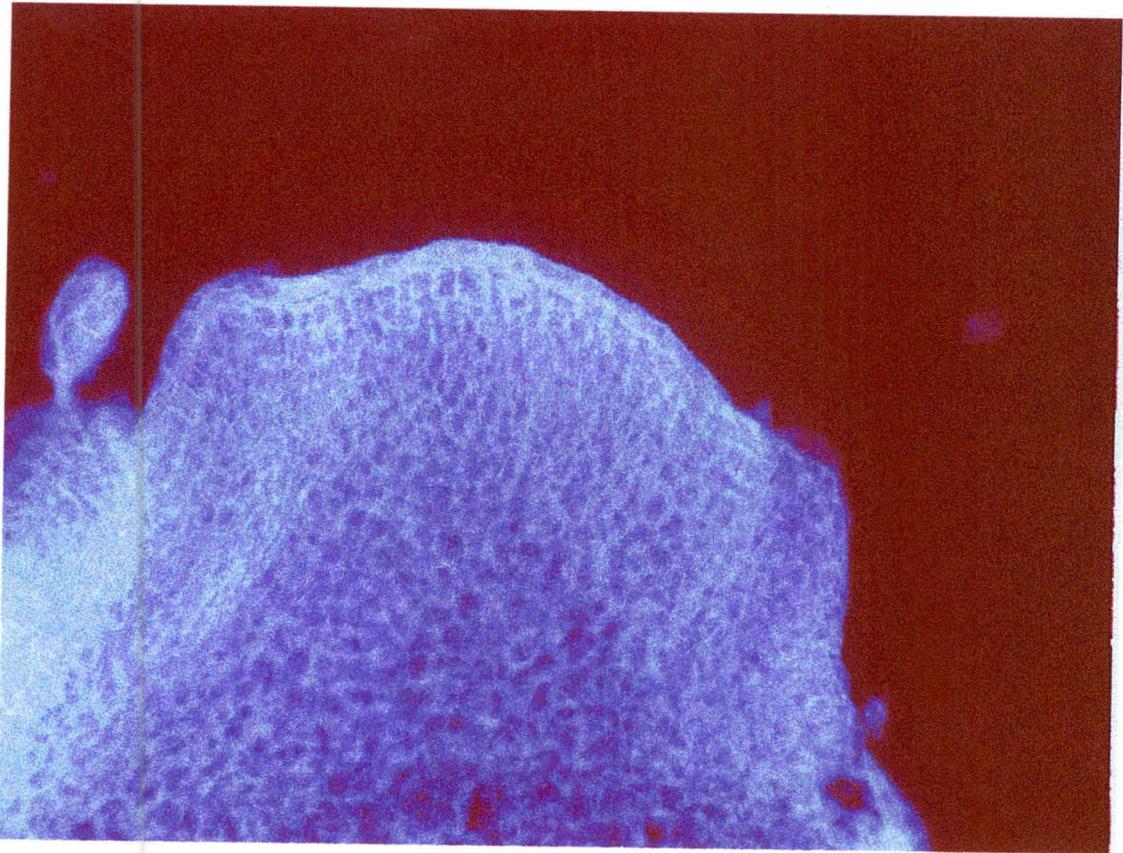


Figure 4.15: *Méristème sous illumination U.V. après coloration au calcofluor.*

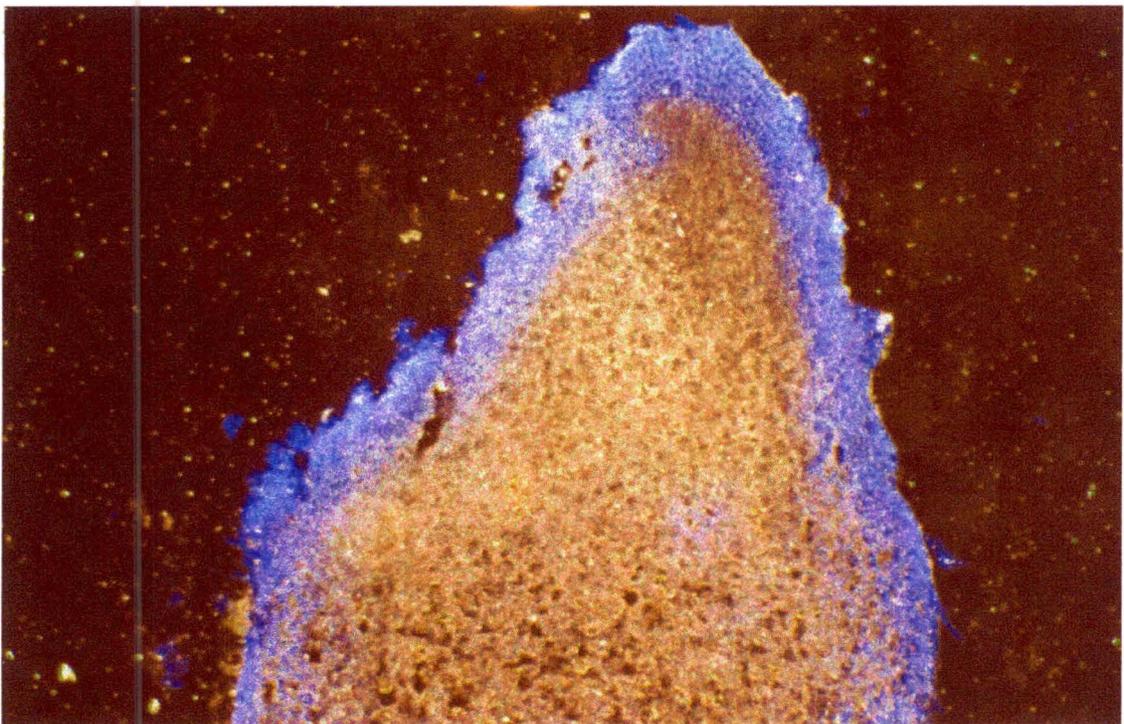


Figure 4.16: *Exemple typique de réfringence.*

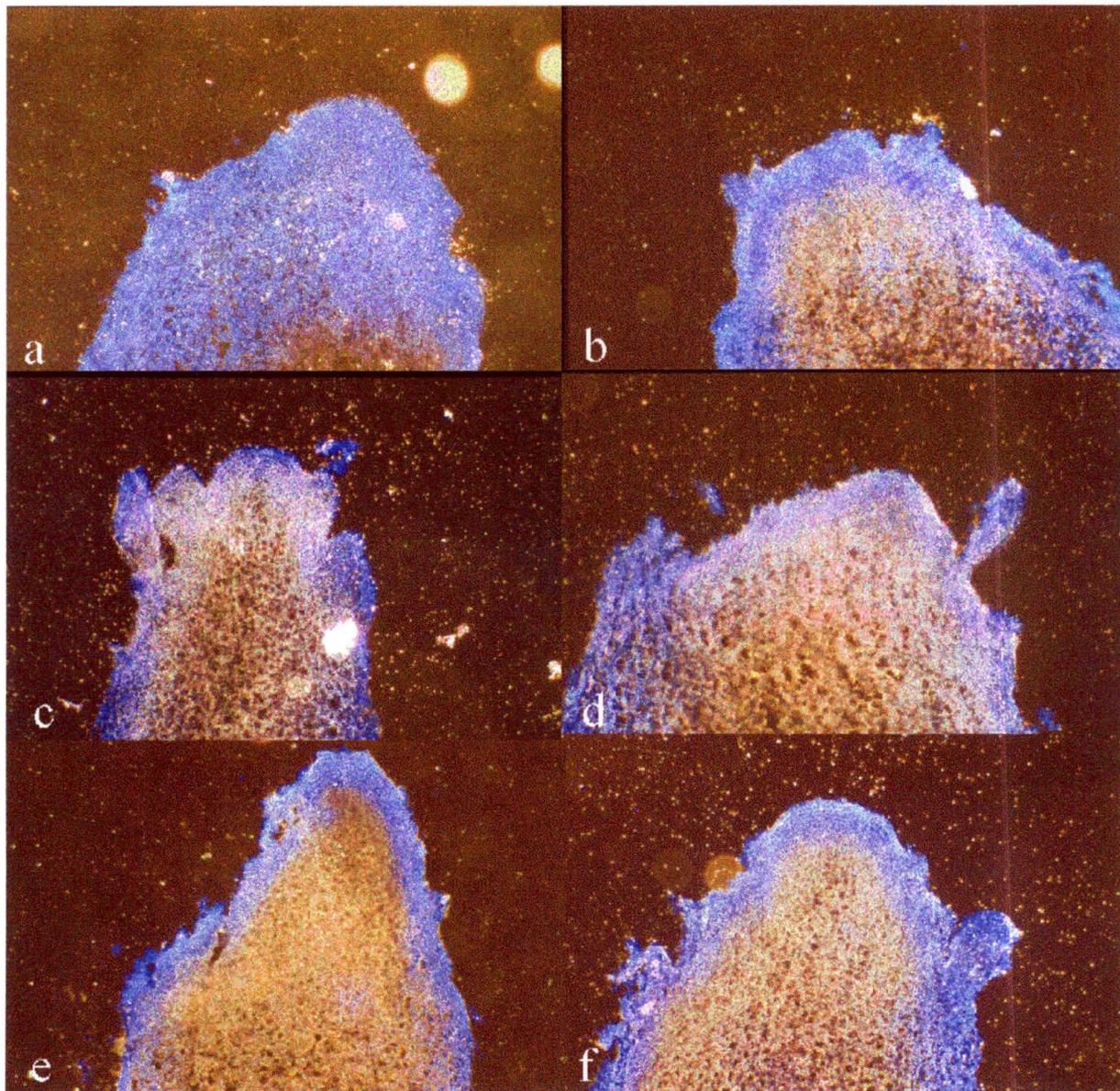


Figure 4.17: Résultats du premier test PME. (a) V12 (b) I12 (c) V16 (d) I16 (e) V20 (f) I20.

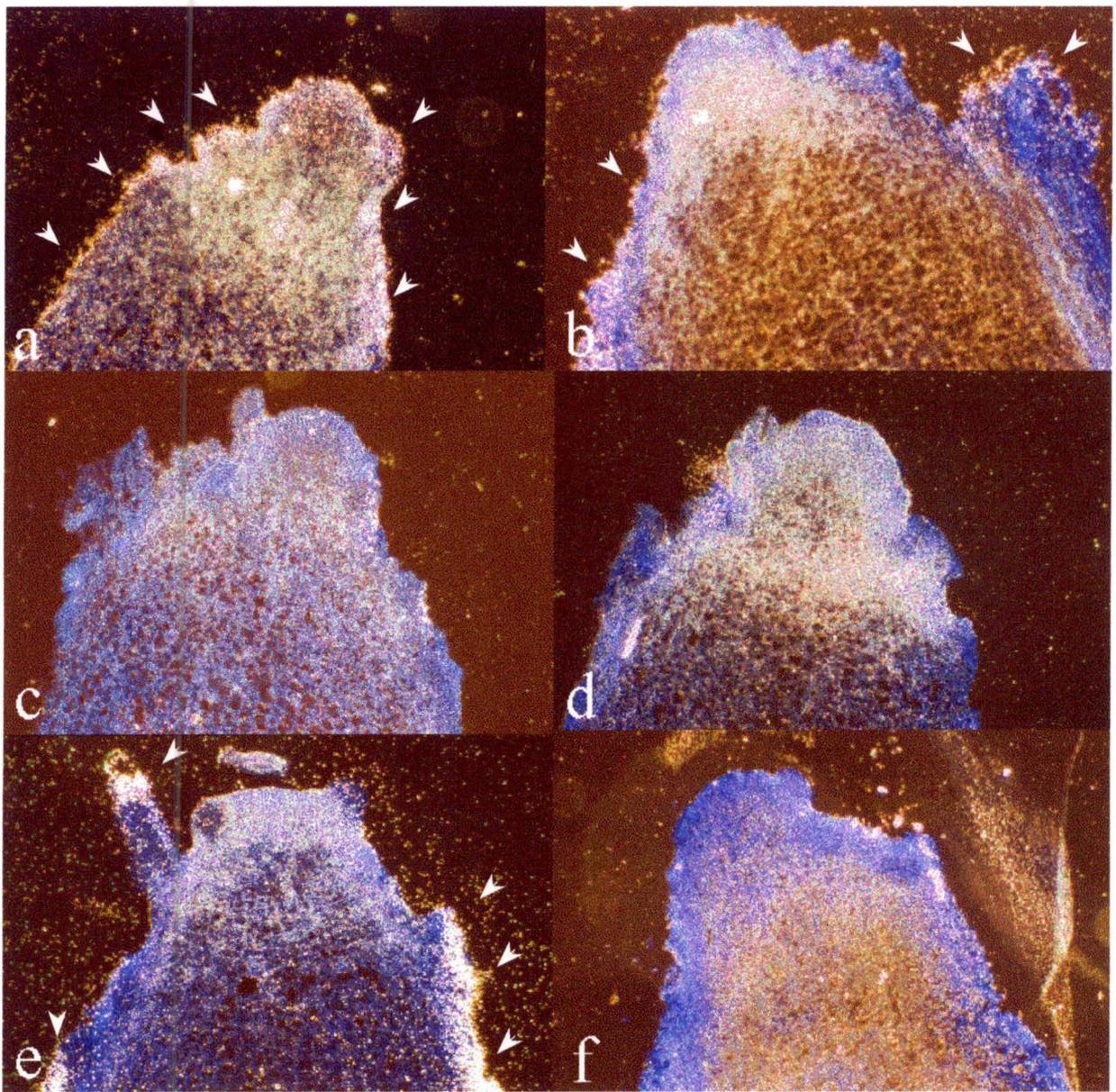


Figure 4.18: Résultats du second test PME. (a) V12 (b) I12 (c) V16 (d) I16 (e) V20 (f) I20.



Figure 4.20: Contrôle sens.

Ce premier essai n'a pas fonctionné. Cela démontre bien l'importance de tests préliminaires lors de l'utilisation de nouvelles techniques longues et contraignantes.

3.2. Tests PME

Les 2 séries d'hybridations « PME » ont été réalisées à une semaine d'intervalle l'une de l'autre. Certaines modifications proposées à la fin de la section précédente ont été appliquées dès le premier test PME réalisé dans la dernière semaine d'avril. La semaine suivante, lors du deuxième test PME, une seconde modification a été apportée: nous avons décidé de changer la température d'hybridation. Etant donné le temps d'exposition extrêmement long, et le temps limité dont nous disposions, il ne nous était pas possible d'attendre les résultats du premier test PME pour apporter des modifications au protocole en vue de l'hybridation suivante. Nous sommes donc passés d'une température d'hybridation de 42°C à une température d'hybridation de 37°C: celle-ci, plus basse, favorise l'hybridation. Il est entendu que cette réduction favorise la formation d'hybrides spécifiques et aspécifiques. Cependant, les étapes de lavage postérieures doivent pouvoir réduire fortement cette aspécificité: on se rappelle en effet qu'un des bains « post-hybridation » est exécuté pendant 30 minutes à 55°C. Cette température élevée devrait permettre d'éliminer les hybrides aspécifiques. Nous avons également augmenté la quantité de sonde comme décrit ci-avant.

Pour permettre de se rendre compte de ce que qu'on observe typiquement lors d'un marquage, on se référera aux résultats présentés dans la figure 4.14 illustrant des résultats obtenus dans la publication concernant le gène SaMADS D (Bonhomme *et al.*, 1997).

Pour chaque type de temps analysé, on réalise de 4 à 5 lames comportant à chaque fois de 5 à 6 objets. Les échantillons sont hybridés dans la majorité des cas avec la sonde antisens, mais des contrôles négatifs avec la sonde sens sont également réalisés.

En plus de l'analyse des différents échantillons prélevés de la 12^{ème} à la 20^{ème} heure, des contrôles positifs sont réalisés avec la sonde antisens SaMADS D sur des échantillons V96 et I96. Un contrôle négatif est également réalisé avec la sonde sens SaMADS D sur les mêmes prélèvements V96 et I96.

Les coupes apparaissent typiquement en lumière U.V. comme illustré en figure 4.15. On fera la distinction entre la marquage et les phénomènes de réfringence. La figure 16 donne un exemple typique de réfringence (zone centrale plus claire).

3.2.1. Résultats du premier test PME

Les résultats obtenus suite au premier test d'hybridation avec nos sondes sont illustrés en figure 4.17.

Comme on l'observe sur ces figures, aucun marquage n'apparaît de façon significative. Les zones centrales qui apparaissent en plus clair sur les photos sont des zones de réfringence. On n'observe pas non plus de marquage sur les lames SaMADS D. Toutes ces lames ont été développées après 4 semaines d'exposition.

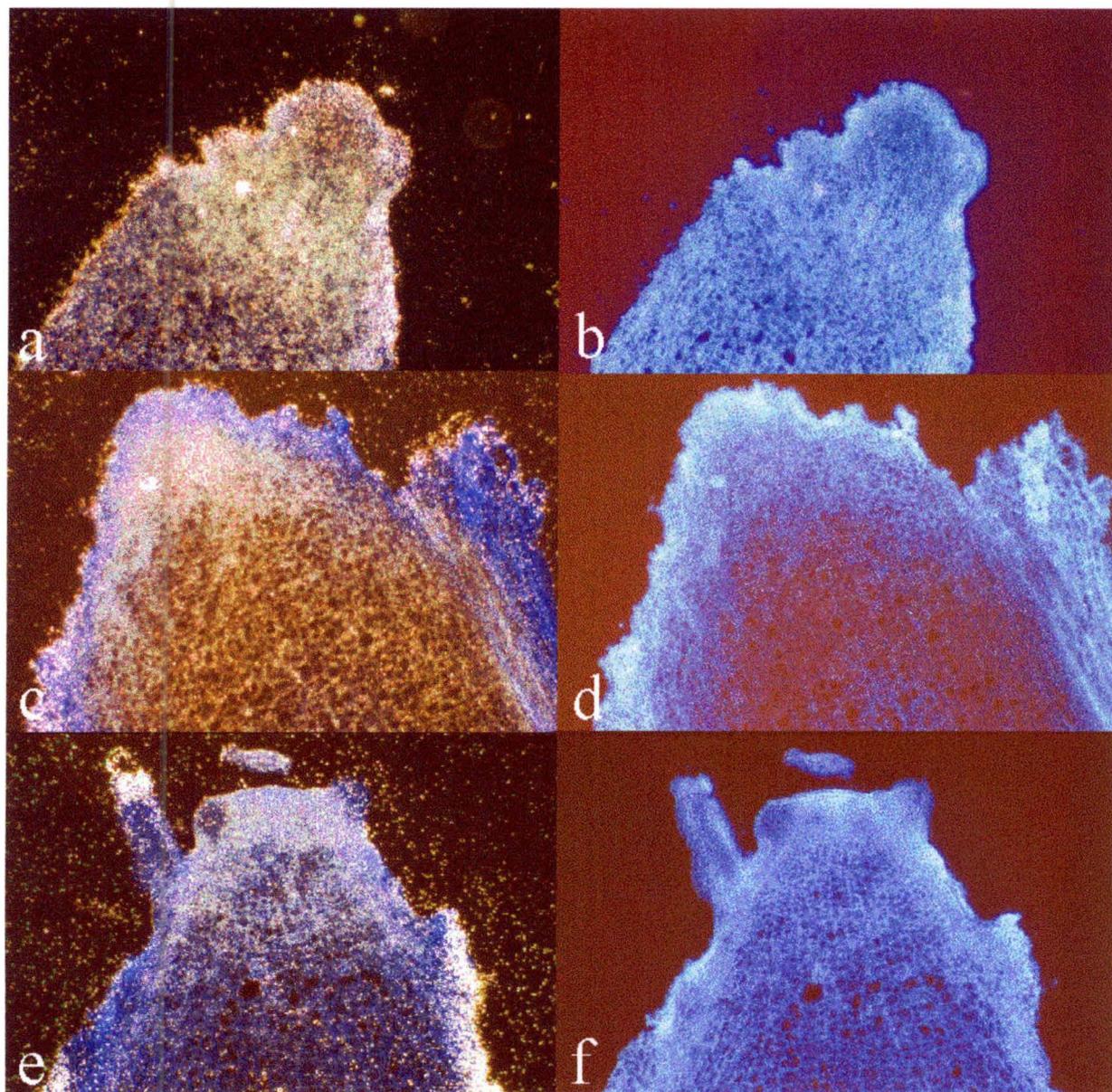


Figure 4.19: Résultats du ~~premier~~ ^{Second} test PME. Images avec ou sans marquage. (a/b) V12 (c/d) I12 (e/f) V20.

3.2.2. Résultats du second test PME

Les résultats obtenus suite au second test d'hybridation avec nos sondes est illustré en figure 4.18. Cette fois, on voit apparaître un marquage significatif, surtout au niveau des temps V12 (a), I12 (b) et V20 (b. Ce marquage est indiqué sur les illustrations par les flèches blanches. Il ne s'agit clairement pas de phénomènes de réfringence comme observé précédemment.

La figure 4.19 permet de mieux se rendre compte du marquage: on trouvera du côté gauche les images obtenues avec l'éclairage U.V. et le fond noir. Sur la droite, on trouvera une photo des mêmes objets mais en absence du marquage. Ces dernières photographies ont été obtenues en travaillant uniquement sous illumination ultraviolette.

Un marquage apparaît donc au niveau de ces lames antisens alors qu'aucun marquage ne s'observe sur les lames sens de cette même série (figure 4.20). Cependant, les contrôles SaMADS D ne présentent aucune hybridation au terme des trois semaines qui ont été nécessaires pour obtenir ces résultats.

4. Discussion

Un des premiers problèmes auquel nous avons été confrontés est qu'il ne nous a pas été possible d'obtenir d'hybridation sur les contrôles positifs SaMADS D, ce qui soumet à caution les éventuelles hybridations observées sur les test PME.

Cependant, il est apparu que le nombre de cpm par lames lors des tests SaMADS D était très faible en comparaison des tests PME: 422038 cpm pour une lame AS SaMADS D contre 1003044 cpm (premier test PME) à 1504566 cpm (second test PME) sur une lame PME AS (antisens), ce qui peut expliquer l'absence de marquage observé au terme des 3 à 4 semaines.

Les problèmes de reproductibilité rencontrés entre les deux tests PME et au sein d'un même test ne permettent aucune interprétation des résultats. Ce problème de reproductibilité pourrait être dû, au moins partiellement, au problème que nous avons déjà évoqué de remise en solution de la sonde. Bien qu'aucune interprétation ne soit envisageable, il apparaît cependant clairement qu'une hybridation a bel et bien eu lieu lors du deuxième test PME. La nature de cette hybridation est cependant non définie. Il pourrait en effet s'agir d'une hybridation non spécifique ou d'une hybridation de m-RNA de PME induit par la méthode de prélèvement ou, enfin, de l'expression constitutive des PME puisque la localisation est similaire pour les trois temps positifs. Quoiqu'une expression constitutive devrait être présente partout, il se pourrait cependant que leur présence soit supérieure dans certaines zones tout au long de la vie de la plante.

Nous avons, lors du prélèvement, éliminé la majorité des feuilles naissantes. Cette excision a pu provoquer des dégâts aux tissus environnants. Etant donné qu'il a été établi que l'altération de la paroi, que ce soit lors du mûrissement, de la croissance, ou des interactions hôte/pathogène, pouvait induire une augmentation de l'activité de certaines pectinases (Collmer and Keen, 1986), il est envisageable que le stress subi lors du prélèvement ait activé l'expression de certaines PME. Cette hypothèse est à prendre avec la plus grande circonspection, car aucune donnée sur le temps requis pour qu'une telle transcription ait lieu n'est en notre possession. De plus, les échantillons sont plongés dans une solution de fixation

endéans les cinq minutes qui suivent le prélèvement, laissant, selon toute vraisemblance, peu de chance à une telle transcription d'avoir lieu ou du moins d'être détectable.

Bien que le marquage apparaisse toujours dans les mêmes zones, sur les quelques lames positives que nous avons obtenues, il pourrait néanmoins s'agir d'hybridation non spécifique. En effet, lors de leurs travaux sur les gènes SaMADS, les chercheurs du département de physiologie végétale de l'Université de Liège ont parfois pu observer un marquage localisé sur le pourtour des échantillons (résultats non publiés). Étant donné que dans le cas de SaMADS D, un marquage en périphérie est inconcevable avec les résultats précédemment obtenus, cette hybridation en périphérie de l'échantillon est, dans ce cas précis, à considérer avec prudence.

Dans notre cas, ce type de marquage pourrait cependant être spécifique: en effet, Mareck *et al.*, publiaient un article en 1995 où des travaux d'immunodétection de PME chez le lin apportent des résultats allant dans ce sens. Effectivement, même si le marquage des PME s'est avéré être distribué dans toutes les parties de l'hypocotyle, il n'était cependant pas homogène et apparaissait renforcé dans la zone apicale ainsi qu'au niveau de l'épiderme, ce dernier apparaissant plus marqué que les tissus internes (Mareck *et al.*, 1995).

S'il s'avérait que le marquage que nous avons observé est effectivement spécifique, il s'agirait d'un résultat encourageant la poursuite de la mise au point de la détection de l'expression des PME dans le méristème par la technique d'hybridation *in situ*, notamment afin d'en améliorer la reproductibilité.

Une des conclusions pouvant être tirée de ces observations est que la méthode de prélèvement est à revoir: lors de prélèvements ultérieurs, on veillera à ne pas endommager les tissus analysés. Pour ce faire, on procédera uniquement à l'élimination des feuilles de grande taille proches du méristème apical. Les jeunes feuilles et les éventuels primordia seront laissés en place. Cette approche permettrait, en outre, l'analyse des PME dans les tissus en se trouvant dans l'environnement direct de l'apex. L'image « e » de la figure 4.18 semblerait confirmer, s'il s'avérait que nous avons à faire à du marquage spécifique, l'intérêt de l'étude de ces tissus. Cette illustration montre du marquage au niveau d'une jeune feuille proche (en haut à gauche) de la zone méristématique.

Perspectives

Perspectives

Un premier problème que nous avons constaté au cours de ces tests d'hybridations est l'absence de marquage sur les témoins positifs SaMADS D. Cette absence de marquage nous a poussés à analyser les résultats obtenus avec la plus grande prudence.

Bien que cette absence de marquage sur les lames SaMADS D puisse provenir du faible nombre de cpm présents sur chacune des lames, nous avons également constaté la même chose sur certaines des lames PME: dans ce dernier cas, un problème de remise en suspension de la sonde peut être à l'origine des différences observées entre les lames des deux séries et au sein de la même série.

Il est cependant apparu qu'une hybridation a bel et bien eu lieu sur certaines lames de la dernière série PME. La nature de ces hybridations est, à ce jour, non définie. Il pourrait s'agir d'un marquage non spécifique. Cependant les ressemblances observées dans la localisation du marquage entre les différentes coupes laisse entrevoir deux autres hypothèses concernant l'origine de cette hybridation. Il pourrait s'agir d'une hybridation spécifique de messagers de PME. La production de ces messagers pourrait être induite par la méthode de prélèvement des échantillons ou se trouver dans les tissus de manière constitutive, comme le laisse supposer la ressemblance observée entre les différentes lames positives. Une telle hybridation serait, de plus, concordante avec des résultats observés chez le lin.

Quoi qu'il en soit, il n'est pas possible de confirmer ou d'infirmer l'une ou l'autre des hypothèses avancées ci-dessus.

Des modifications au protocole de prélèvement des échantillons pourront très probablement permettre d'avancer dans l'interprétation des résultats obtenus. Une fois la mise au point de l'ensemble des facteurs intervenant dans l'HIS effectuée, et après l'obtention de résultats reproductibles, il serait envisageable d'étudier l'évolution de chaque isoforme au cours de la transition florale. Cette étude pourrait permettre de dresser un profil détaillé des différents intervenants jouant un rôle dans les modifications se produisant lors du passage de l'état végétatif à la phase reproductive.

Comme on le voit, l'hybridation *in situ* est une technique pleine de potentialités.

Annexes

L'Hybridation *In Situ*

1. Introduction

Le principe de l'hybridation *in situ* est l'appariement de séquences de bases complémentaires: une des séquences est la sonde et l'autre, sa cible. L'originalité de ce type d'hybridation est qu'elle se fait directement sur les échantillons. L'HIS se distingue des hybridations classiques par l'accessibilité des séquences à la sonde (fonction des traitements réalisés lors de la fixation, perméabilisation), et par l'exposition de la sonde aux constituants cellulaires, ce qui augmente le risque de fixation aspécifique et par là-même, le bruit de fond.

Cette technique, outre son aspect visuel, apporte des informations précieuses concernant l'expression de gènes dans des cellules particulières. La sensibilité de la technique lui permet de détecter la quantité de matériel contenu dans une seule cellule. L'hybridation *in situ* permet de réaliser des dizaines d'analyses sur l'échantillon dont on dispose, alors qu'une méthode de type « blot » nécessite dès le départ beaucoup plus de matériel et que le filtre ne peut servir qu'à quelques hybridations: la constitution de banques de tissus permettra de compléter l'analyse d'un échantillon à mesure que des nouvelles sondes apparaissent, ce qui constitue aussi un des grands intérêts de la technique.

Les duplex formés peuvent être de trois types. En les classant par ordre de stabilité croissante, on a: ADN/ADN, ADN/ARN ou ARN/ARN.

Etant donné le caractère un peu particulier de l'hybridation, cette technique reste une méthode où l'adaptation au matériel utilisé reste essentielle. La stringence de l'hybridation est un des points importants: si celle-ci n'est pas assez stringente, il risque d'y avoir aspécificité des fixations et si la stringence est trop importante, c'est une perte de signal qui peut se produire. Un autre aspect essentiel est l'utilisation de contrôles appropriés afin de pouvoir interpréter correctement les résultats obtenus.

Les différentes étapes réalisées au cours d'une expérience d'hybridation sont: la fixation et la section des tissus, la préparation à l'hybridation (augmentation de l'accessibilité de la sonde aux tissus) et la diminution du nombre de sites de fixation aspécifiques. Après l'hybridation proprement dite, on termine par l'étape de révélation et de coloration des coupes.

2. Aspects techniques

2.1. Inclusion paraffine: fixation et section

Le but de l'étape de fixation est de consolider les structures en créant de nouvelles liaisons intermoléculaires. Un fixateur efficace:

- permettra de préserver les acides nucléiques dans la cellule
- ne réagira pas avec les groupements pour les laisser accessibles à la sonde
- n'induera pas la formation de liaison aspécifique.

Bien que rendant possible une bonne conservation des acides nucléiques, les solutions de méthanol ou d'acide acétique ne seront pas utilisées car elles favorisent la fixation aspécifique de la sonde nucléique sur les constituants cellulaires.

On utilisera classiquement des aldéhydes telles que la formaldéhyde, la paraformaldéhyde ou la glutaraldéhyde. Le choix du fixateur sera fonction de la taille de la sonde car ces différents composés induisent un maillage moléculaire plus ou moins serré, ce qui influence l'accessibilité aux tissus. La paraformaldéhyde permet de garder la meilleure morphologie tout en garantissant l'accessibilité de la sonde à la cible, ce qui est particulièrement important pour les sondes de grande taille. On utilisera de la paraformaldéhyde fraîchement préparée car des produits de dégradation des aldéhydes peuvent se former avec le temps et faire augmenter le bruit de fond. Les problèmes causés par une fixation excessive peuvent se faire sentir non seulement au niveau de l'accessibilité, mais également au niveau de l'adhérence de l'échantillon sur la lame en verre, probablement en jouant au niveau des charges portées par l'échantillon (Wilcox, 1993).

Après cette étape de fixation, on soumet l'échantillon à des bains de déshydratation pour enfin terminer par l'étape d'inclusion en paraffine. L'inclusion facilite la coupe et la conservation des tissus. Les tissus inclus peuvent être conservés de nombreuses années sans perte significative du signal (Wilcox, 1993). Cette technique permet une meilleure conservation des structures que l'hybridation sur cryosection. L'inclusion en paraffine présente cependant l'inconvénient d'une perte de signal d'environ 25 % par rapport aux cryosections (Wilcox, 1993).

La préparation des lames est une étape critique, car c'est d'elle que va dépendre le maintien de l'échantillon sur la lame au cours des différentes étapes de préparation à l'hybridation et de lavage post-hybridation. Alors que la gélatine est couramment utilisée pour l'adhésion des tissus aux lames histologiques, celle-ci est tout à fait déconseillée pour l'HIS, car le détachement des échantillons est total. Les substances les plus souvent citées (Wilcox, 1993, Christensen *et al.*, 1998, Angerer and Angerer, 1989) sont la poly-L-lysine, des lames Superfrost/plus ou Vectabond.

2.2. Cryosection

La cryosection offre une alternative à la méthode fixation/section. Cette technique est particulièrement intéressante dans le cas d'analyses en routine où des résultats rapides sont attendus. Ici, les échantillons sont congelés très rapidement via immersion dans l'isopentane (réduit les risques de formation de cristaux de glace et d'endommagement des structures cellulaires) refroidi à la température de l'azote liquide. Les échantillons seront récupérés sur lames traitées à la poly-L-lysine et ensuite fixés. Cette méthode est rapide mais peut induire une perte de la qualité du signal (au point de vue de la qualité de la localisation de la sonde).

2.3. Préparation de la sonde

Les sondes utilisées peuvent être de trois types: ADN, ARN ou oligonucléotidiques. On utilisera dans tous les cas des sondes simple brin pour éviter les phénomènes d'autocompétition induit par la présence du brin complémentaire sur les sondes doubles brins (Angerer and Angerer, 1989).

Les sondes les plus utilisées sont les sondes RNA étant donné qu'elles sont faciles à produire en grandes quantités et qu'on peut réaliser une diminution plus importante du bruit de fond en effectuant une étape de digestion post-hybridation avec une RNase (Angerer and Angerer, 1989). Les hybrides formés par l'hybridation RNA/RNA étant les plus stables, on peut également réaliser des lavages plus stringents (T° ou concentration saline) pour diminuer le bruit de fond. Cependant, il faut préciser que ce type de travail est délicat car la présence de

RNAses à un moment inopportun peut détruire les sondes avant hybridation. La synthèse de la sonde est généralement réalisée après avoir inséré le fragment d'intérêt dans un plasmide disposant de deux promoteurs, orientés en sens opposés de part et d'autre de l'insert. Ces promoteurs sont généralement T₃, T₇ ou SP6.

Les sondes oligonucléotidiques ont pour avantage leur petite taille, ce qui leur permet une pénétration plus facile de l'échantillon. Mais cette taille réduite peut aussi être une source d'hybridation aspécifique (taille de 16 à 32 bases). Dans ce cas, l'utilisation d'ADN compétiteur (ADN de sperme de saumon...) pour bloquer les sites aspécifiques n'est pas envisageable car il risque d'épuiser la sonde. Le marquage de la sonde est réalisé en allongeant l'extrémité 3'; ce marquage étant faible, seul l'utilisation de ³²P est envisageable (Morelle, 1994).

2.4. Marquage des sondes

Le marquage des sondes peut se faire radioactivement ou non. Le choix de l'isotope ou du fluorochrome sera fonction du type de sonde et de sa cible.

2.4.1. Marquage radioactif

2.4.1.1. Sondes radioactives

Trois isotopes sont principalement utilisés: ³²P, ³⁵S, ³H et ³³P. Ceux-ci sont placés sur les nucléotides utilisés lors de la synthèse de la sonde. Chacun dispose de propriétés caractéristiques:

- ³²P est un émetteur de rayons β d'énergie élevée
permet une grande sensibilité de détection et/ou un temps d'exposition faible
dispose d'une faible résolution (à l'échelle cellulaire)
possède une demi-vie courte (14.3 jours)
- ³H est un émetteur β d'énergie faible (100 fois moins que ³²P)
donne des résultats très fins (résolution élevée)
nécessite une durée d'exposition très longue
demi-vie de 12.4 ans.
- ³⁵S possède une énergie de rayonnement 10 fois inférieure à celle du ³²P
émet des rayonnements β avec une demi-vie de 37.4 jours
constitue un bon compromis entre ³H et ³²P
peut réagir avec les constituants cellulaires; on doit maintenir la sonde à l'état réduit avec du DTT (dithiothréitol).
peut poser certains problèmes lors de l'incorporation par la polymérase
- ³³P possède une énergie d'émission qui se situe entre celle de ³⁵S et ³²P
demi-vie de 25 jours.

³H donne la meilleur résolution de tous les isotopes mais l'efficacité autoradiographique la plus basse (0.02 grains par désintégration dans une couche de 5 μm d'épaisseur). L'utilisation de nucléotides triphosphates substitués avec le ³⁵S permet d'avoir une activité spécifique de l'ordre de 10 fois supérieure (1 10⁹ dpm/μg) à ceux marqués avec

^3H et une efficacité autoradiographique d'environ 5 fois supérieure. Le signal peut être obtenu plus rapidement mais on voit apparaître les problèmes de bruit de fond qui affectent la sensibilité. La résolution est adéquate pour la plupart des applications. Le ^{35}S sera particulièrement indiqué pour la détection de m-RNA dont la concentration est inférieure à 0.1% des m-RNA totaux (Angerer and Angerer, 1989). Les sondes marquées au ^{32}P ont une activité spécifique très élevée et peuvent être utilisées avec des films autoradiographiques. Cet isotope permet de déterminer des régions ou des organes contenant l'élément recherché, mais la résolution est insuffisante pour une localisation très précise des cellules marquées (Angerer *et al.*, 1987).

Certaines procédures peuvent être utilisées pour réduire le bruit de fond de sondes ribonucléotidiques (Angerer and Angerer, 1989):

- toujours garder la sonde sous forme réduite en ajoutant du DTT dans le milieu après synthèse de la sonde et hybrider en présence de DTT
- réaliser une première étape de lavage longue pour retirer les sondes non hybridées: ce bain contient une concentration élevée en sels (4X SSC) et du DTT (10 mM)
- réaliser des étapes de rinçage favorisant un haut degré de stringence
- utiliser des sondes RNA dépourvues de séquences du vecteur, celles-ci ayant tendance à réagir avec le RNA ribosomal
- réaliser une étape de traitement à la RNase A après l'hybridation pour éliminer les sondes non hybridées (élimination des sondes simple brin). L'addition de RNase T₁ peut contribuer à diminuer le bruit de fond dans le cas de signal faible (Angerer *et al.*, 1987).

2.4.1.2. Détection du marquage

La détection se fait par autoradiographie soit en utilisant un film autoradiographique ou en posant une émulsion sur la lame à analyser.

détection par émulsion

On plonge les lames hybridées dans une émulsion photographique liquide (Ilford K5 ou Kodak NTB2). L'épaisseur du film et l'isotope utilisés affecteront la sensibilité, la résolution et le bruit de fond. Les résultats obtenus avec l'émulsion photographique étant basés sur la réduction de grains d'argent, il est important de retirer toute trace de DTT (agent réducteur puissant) de l'échantillon, sous peine d'obtenir un bruit de fond élevé. Le marquage sera bien visible quand on observera les coupes sur un microscope à contraste de phase ou mieux, via un microscope à fond noir. Pour une meilleure analyse et la mise en évidence de zones spécifiques, on peut procéder à une coloration post-révélation à l'aide des colorants classiques de l'histologie (HES, Toluidine...) (Morelle, 1994).

détection par film autoradiographique

Cette méthode de détection n'est appliquée que pour le ^{32}P et n'offre pas tous les détails que fournit l'émulsion. Le film peut cependant intervenir lors de marquages avec des sondes ^{35}S . Dans ce cas, le film permet de voir si l'expérience a fonctionné et d'évaluer la durée d'exposition requise, cette durée étant généralement 3 à 5 fois plus longue que pour le film (Morelle 1994).

2.4.2. Marquage non radioactif

On utilise pour ce type de marquage des nucléotides sur lesquels on a couplé une molécule organique qui sera révélée par après. Celle qui est la plus souvent utilisée est la biotine. Cette vitamine dispose naturellement d'une très forte affinité envers la streptavidine ($K_D 10^{-15}$).

On synthétise la sonde en présence de biotine UTP, on révélera via une streptavidine couplée à une enzyme ou à un fluorochrome, on pourra même amplifier le signal.

Les enzymes les plus communément utilisées sont la phosphatase alcaline, la peroxydase et la β -galactosidase; toutes produisent un signal coloré en présence de leur substrat.

Un autre type de marquage est celui réalisé à l'aide de digoxygénine, un stéroïde végétal reconnu par les fragments Fab anti-digoxygénine d'un anticorps couplé, par exemple, à la phosphatase alcaline.

L'utilisation de sondes fluorescentes présente l'avantage de ne pas nécessiter d'étape de révélation et permet la réalisation de plusieurs marquages avec des sondes différentes (à chaque fois couplées à un fluorochrome particulier) sur le même échantillon.

On peut enfin utiliser des sondes chémiluminescentes: celles-ci offrent des seuils de détection de l'ordre de 10^{-18} M. Leur utilisation pour les immunodosages est déjà bien répandue, bien que la marquage *in situ* soit encore à améliorer. (P. Lorimier, repris de Morelle, 1994).

L'amplification de signaux obtenus non isotopiquement est possible via un marquage multiple de la séquence cible. On utilise alors des sondes de même activité spécifique, dirigées contre des régions différentes de la même séquence d'intérêt. Cependant, l'élévation totale de la concentration en sondes entraîne également des risques de fixation aspécifique. L'utilisation de processus faisant intervenir la numérisation d'image permet également une amplification des signaux qui seront alors traités par ordinateur (Morelle, 1994).

2.5. Prétraitements avant hybridation

Après l'étape de fixation des échantillons, différents traitements en vue de perméabiliser la cellule à la sonde vont être réalisés, alors que d'autres viseront à éviter la fixation non spécifique de cette même sonde.

Une des premières étapes de ce prétraitement est une élimination partielle des protéines via un traitement enzymatique (protéinase K, protéase, pronase), chimique (HCl, détergents) ou même par un bref passage des lames au micro-onde.

Une deuxième étape importante est le traitement à l'anhydride acétique des lames. Ce traitement évite la fixation de sondes sur des structures cellulaires par liaisons ioniques (NH_3^+ des protéines et PO_3^- des acides nucléiques) ou par complémentarité stérique. L'anhydride acétique a pour effet d'acétyler les groupements aminés. Un point important qui est encore à

signaler est que l'acétylation ne semble pas réduire, de façon perceptible, l'hybridation spécifique (Hayashi *et al* 1978).

Bien que, selon Wilcox, cette dernière étape ne soit pas nécessaire pour les transcrits d'une taille inférieure à 1.3 kb (Wilcox, 1993), un dernier traitement est réalisé, non pas au niveau de l'échantillon, mais au niveau de la sonde: l'hydrolyse carbonate. Cette étape vise à diminuer la longueur de la sonde pour favoriser son accessibilité aux sites d'hybridation (Morelle, 1993, Angerer and Angerer, 1989). Wilcox argumente son choix en disant que l'hydrolyse basique produit des fragments de tailles très variables et que les plus petits fragments générés peuvent manquer de spécificité, augmenter la fixation aux tissus, et donc le bruit de fond. (Wilcox, 1993).

2.6. Hybridation

L'hybridation se réalise en présence d'un pourcentage élevé de formamide (50%) (Wilcox, 1993). Comme on le sait, la température de « melting » est influencée par la quantité de A/T et G/C ainsi que la concentration en formamide du milieu. Cette concentration élevée en formamide permet de diminuer la température d'hybridation vers des zones compatibles avec le maintien des structures cellulaires (aux alentours de 42°C). Bien que cette température soit relativement basse en comparaison avec d'autres hybridations du même type, il faut souligner que dans le cas de l'HIS, la stringence de l'hybridation est également contrôlée lors des étapes ultérieures de post-hybridation (Angerer *et al.*, 1987).

L'hybridation est en général suffisante après 4 heures, mais on la réalise communément « overnight » sans que cela ne pose de problème (Wilcox, 1993).

2.7. Traitements post-hybridation

Les opérations réalisées après l'hybridation ont pour but d'éliminer les fixations non spécifiques et les sondes en excès. On réalise des bains de SSC 2X et de RNase A à 37°C pour éliminer les RNA simple brin. Ce traitement à la RNase va réduire le signal spécifique mais permettra aussi de réduire le bruit de fond, ce qui est important dans les cas où l'on veut mettre en évidence des transcrits peu abondants. On réalisera encore un bain de SSC 0.1x à 55°C, cette étape de lavage étant très stringente. Des bains d'éthanol contenant 0.3M en NH₄Ac terminent les traitements de post-hybridation.

2.8. Les contrôles

Un des derniers points importants concernant l'hybridation *in situ* est sans doute le choix d'un bon contrôle. En effet, le bruit de fond est un problème, mais l'interprétation des résultats en est un autre.

Des traitements avec des DNases ou des RNases avant hybridation ont souvent été utilisés comme contrôle pour déterminer le bruit de fond. Cependant, il est difficile de retirer entièrement le DNA ou le RNA des sections, et il est de plus nécessaire de démontrer que la réduction du signal par les RNases n'est pas due à la dégradation de la sonde par des RNases résiduelles (Angerer *et al.*, 1987).

L'utilisation de la sonde sens et antisens est un moyen fréquent de contrôle pour l'hybridation *in situ* avec des riboprobes (Wilcox, 1993).

3. Conclusions

L'hybridation *in situ* est une technique dont les résultats peuvent apporter des informations utiles et nouvelles sur la localisation de l'expression de gènes ou sur le type de cellules qui l'expriment. Sa grande sensibilité et la faible quantité de matériel nécessaire peuvent en faire un outil de diagnostic intéressant à utiliser en routine. Cette technique est basée sur l'hybridation de deux brins complémentaires. Le marquage peut se faire radioactivement ou non radioactivement selon le matériel, le temps et les résultats dont on veut disposer. La réduction de l'hybridation non spécifique est une étape importante et est principalement réalisée par des traitements post-hybridation. Cette technique s'applique avec succès aussi bien sur les tissus animaux que végétaux (Christensen *et al.*, 1998). La technique peut même être utilisée pour le « mapping » sur chromosome, par exemple des chromosomes polyténiques de *Drosophila melanogaster* (Hayashi *et al.*, 1978). Enfin, le couplage de cette technique à la cytométrie en flux peut permettre la détection de micro-organismes, par exemple dans les eaux usées (Wallner, repris de Morelle, 1994).

Bibliographie

- Albani, D., Altosaar, I., Arnison, P.G., and Fabijanski, S.F. (1991) A gene showing sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*. Sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters.. *Plant Mol. Biol.* **16**: 501-513.
- Albersheim, P., and Darvil, A. (1985). Les oligosaccharides. *Pour la science*. **Novembre**: 18-26.
- Angerer, L.M., Cox, K.H., and Angerer, C.R. (1987) Demonstration of Tissue-Specific Gene Expression by in Situ Hybridation. *Methods in Enzymology*. **152**: 649-661.
- Angerer, L., Angerer, R.C. (1989) In Situ Hybridation With ³⁵S-Labeled RNA Probes. *Du Pont Biotech Update*. **4 (5)**: 3-6.
- Baldwin, E. A., Pressey, R. (1988) Tomato polygalacturonases elicit ethylene production in tomato fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **113**: 92-95.
- Bernier, G. (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 175-219.
- Bernier, Eds, (1989), Events of the floral transition of meristems. *Planf reproduction: From floral induction to pollination*, Lord, E., and Bernier, G., Eds, The American Society of Plant Physioloists Symposium Series, Vol. 1.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. and Lejeune, P. (1993) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*. **5**: 1147-1155.
- Bodson, M., and Remacle, B. (1987) Distribution of assimilates from various source-leaves during the floral transition in *Sinapis alba* L. In: *The manipulation of flowering*, pp. 341-350, Atherton, J.G., ed; Butterworths, London
- Bonhomme, F., Sommer, H., Bernier, G., and Jacquard, A. (1997) Characterization of SaMADS D from *Sinapis alba* suggests a dual function of the gene: in inflorescence developpement and floral organogenesis. *Plant Mol. Biol.* **34**: 573-582.
- Bordenave, M., Breton, C., Goldberg, R., Huet, J-C. (1996) Pectinmethylesterase isoforms from *Vigna radiata* hypocotyl cell walls: kinetic properties and molecular cloning of a cDNA encoding the most alkaline isoform. *Plant Molecular Biology*. **31**: 1039-1049.
- Campbell, A. D., and Labavitch, J. M. (1991) Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectic olygomers in cultured pear cells. *Plant Physiol.* **97**: 699-705.
- Carpita, N.C., and Gibeaut, M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *The Plant Journal*. **3 (1)**: 1-30.
- Christensen, T.M.I.E., Nielsen, J. E., Kreinberg, J.D., Rasmussen, P., Mikkelsen, J.D. (1998) Pectin methyl esterase from orange fruit: characterization and localization by in -situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta*. **206**: 493-503.

- Collmer, A., and Keen, N.T. (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. rev. phytopath.* **24**: 383-409.
- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, D., and Van Onckelen, H. (1999) *Plant physiol.* **119**: 111-121.
- Ebbelaar, M.E.M., Tucker, G.E., Laats, M.M., van Dijk, C., Stolle-Smits, T., and Recourt, K. (1996) Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Paseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* **31**: 1141-1151.
- Gaffe, J., Tieman, D.M., Handa, A.K. (1994) Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. *Plant Physiol.* **105**: 199-203.
- Gaffe, J., tiznado, M.E., and Handa, A.K. (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol.* **114**: 1547-1556.
- Glover, H., Colin, J.B., Lee, E., and Speirs, J. (1996) Mutliple pectin esterase genes are expressed in ripening peach fruit: nucleotide sequence of a cDNA encoding peach pectin esterase. *Plant Physiol.* **112**: 864.
- Guglielmino, N., Liberman, M., Catesson, M.A., Marek, A., Prat, R., Mutaftschiev, S., Goldberg, R. (1997) Pectin methylesterases form poplar cambium and inner bark: localization, properties and seasonal changes. *Planta.* **202**: 70-75.
- Hadfield, K.A., Rose, J.K.C., Yaver, D.S., Berka, R.M., and Bennett, A.B. (1998) Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit support a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant physiol.* **117**: 363-373
- Havelange, A., Bodson, M., and Bernier, G. (1986) Partial floral evocation by exogenous cytokinins in the long-day plant *Sinapis alba*. *Physiol. Plant.* **67**: 695-701.
- Havelange, A., and Bernier, G., (1993) Cation fluxes in the saps of *Sinapis alba* during the floral transition. *Physiol. Plant.* **87**: 353-358.
- Havelange, A., Lejeune, P., Bernier, G., Kaur-Sanwhney, R., and Galston, A.W. (1996) Putrescine exports from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiol. Plant.* **96**: 59-65.
- Hayashi, S., Gillam, I.C., Delaney, A.D., and Tener, G.M. (1978) Acetylation of chromosome squashes of *Drosophila Melanogaster* decreases the background in autoradiographs from hybridization with ¹²⁵I-labeled RNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* **26** (8): 677-679.
- Jarvis, M.C. (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant. Cell and environment.* **7**: 153-164.
- Jin, D. F., and West, C. A. (1983) Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of casbene synthase activity in castor bean seedlings. *Plant physiol.* **74**: 989-992.

- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Walden, R., and Schell, J. (1997) Cell signaling by oligosaccharides. *Trends in Plant Sci.* **2** (3): 11-115.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F. and Galston, A. W. (1988) Spermidine and flower bud differentiation in thin layer explants of tobacco. *Planta.* **173**: 282-284
- Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M-C., Kinet, J-M. (1993) Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Planta.* **190**: 71-74.
- Levy, Y. Y., and Dean, C. (1998) The Transition to Flowering. *The Plant Cell.* **10**: 1973-1989.
- Liners, F., Letesson, J-J., Didembourg, C., and Van Cutsem, P. (1989) Monoclonal antibody against Pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* **91**: 1419-1424.
- Liners, F., and Van Cutsem, P. (1992) Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. *Protoplasma.* **170**: 10-21.
- Mathieu, Y., Sanchez, F. J., Droillard, M-J., Lapouss, D., Laurière, C., and Guern, J. (1996) Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of oligogalacturonides signals in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* **34** (3): 399-408.
- Mareck, A., Gaffé, J., Morvan, O., Alexandre, C., and Morvan, C. (1995) Characterization of isoforms of pectin methylesterase of *linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. *Plant cell Physiol.* **36** (3): 409-417.
- Markovic, O., Kohn, R., (1984) Mode of pectin deesterification by *Trichiderma reesei* pectinesterase. *Experientia* **40**: 842-843.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., and Albersheim, P. (1984) Structure and fonction of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Bioch.* **53**: 625-665.
- Messiaen, et al., 1993
- Messiaen, J., and Van Cutsem, P. (1994) Pectic signal transduction in carrots cells: membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol.* **35** (4): 677-689.
- Micheli, F., Holliger, C., Goldberg, R., and Richard, L. (1997) Characterization of the AtPME3 gene: a new member of the gene family encoding pectin methylesterase-like isoenzymes in *Arabidopsis*. FEBS Letter MVM 334.
- Morelle, C. (1994) Hybridation In Situ. *Le technoscope de biofutur.* **131** (janvier):3-14.
- Mu, J-H, Stains, J.P., and Kao, T-H (1994) Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* **25**: 539-544.

- Nothnagel, E.A., McNeil, M., Albersheim, P., Dell, A (1983) Host-pathogene interactions XXII: A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexines. *Plant Physiol.* **71**: 916-926.
- Ormenesse, S. (1997) Rapport d'activité
- Penel, C., and Greppin, H. (1996) Pectin binding proteins: characterization of the binding and comparison with heparin. *Plant Physiol. Biochem.* **34** (4): 479-488.
- Pidkowich, M. S., Klenz, J.E., and Haughn, G. (1999) The making of a flower: control of floral meristeme identity in *Arabidopsis*. *Trends in plant science.* **4** (2): 64-70.
- Poppe, C., Sweere, U., Drumm-Herrel, H., and Schäfer, E. (1998) The blue light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* **16** (4): 465-471.
- Promé, J.C., and Demont, N. (1993) Les oligosaccharides, des messagers chez les plantes. *Biofutur. Juillet-Août*: 25-28.
- Pryke, J.A., and Bernier, G. (1978) Acid invertase activity in the apex of *Sinapis alba* during transition to flowering. *Ann. Bot.* **42**: 747-749.
- Richard, L., Qin, L-X., Gadai, P., Goldberg, R. (1994) Molecular cloning and characterisation of a putative methylsterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* (L.). *FEBS Letters.* **355**: 135-139.
- Ryan, A. C., and Farmer, E. E. (1991) Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio.* **42**: 651-74.
- Seinda, N.G. (1995) in: Intramolecular chaperones and protein folding. (Shinde, U., Inouye, M., Eds.) Molecular Biology Intelligence Unit, R.G. Landes Company, pp. 181-203, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- Sobry, S. (1997) Etude du rôle des polyamines et des oligogalacturonides au cours de la transition florale chez *Sinapis alba* (L.). Mémoire de fin de Licence.
- Tieman, D.M., Handa, A.K. (1994) Reduction in pectin methylsterase activity modifies tissues integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiol.* **106**: 739-745.
- Thomas, B., and Vince-Prue, D. (1997) Photoperiodism in Plants, 2nd ed. (San Diego, CA:Academic Press)
- Turner, L.A., Harriman, R.W., and Handa, A.K. (1996) Isolation and nucleotide sequence of three tandemly arranged pectin methylsterase genes from tomato. *Plant Physiol.* **112**: 1398.
- Van Cutsem, P., and Messiaen, J. (1994) Biological effects of pectic fragments in plants cells. *Acta. Bot. Neerl.* **43** (3): 231-245.
- Van Cutsen, P. (1996) La paroi cellulaire végétale: de la structure à la fonction, du polymère à l'organisme. *Louvain.* **67**: 16-18.

Varner, J. E., Lin, L-S. (1989) Plant cell wall architecture. *cell*. **56**: 231-239.

Wallner, G, *et al* (1993) cytometry. **14**: 136-143.

Wilcox, J. N. (1993) Fundamental principles of *in situ* hybridation. *The journal of Histochem. and Cytochem.* **41 (12)**: 1725-1733.