



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Une contribution à l'étude de la voie de l'AMPC chez *Nicotiana Tabacum*: analyse des profils de transcription et de phosphorylation du facteur CREB en situation de stress.**

Roulet, Jenny

*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**

**UNE CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VOIE DE L'AMP<sub>c</sub> CHEZ *NICOTIANA  
TABACUM*. ANALYSE DES PROFILS DE TRANSCRIPTION ET DE  
PHOSPHORYLATION DU FACTEUR CREB EN SITUATION DE STRESS**

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

Roulet Jenny

Juin 1999

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Une Contribution à l'étude de la voie de l'AMPc chez *Nicotiana tabacum*.  
Analyse des profils de transcription et de phosphorylation du facteur de  
transcription CREB en situation de stress**

ROULET Jenny

Résumé

L'AMPc est une molécule signalétique très importante chez les procaryotes et les cellules animales. Chez les végétaux, par contre, le rôle physiologique de l'AMPc n'est pas encore clairement établi.

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié le mode d'activation du facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein), une protéine directement activée par la voie de l'AMPc chez les cellules animales.

L'étude de l'activation de ce facteur de transcription a été entreprise, au niveau transcriptionnel, par RT-PCR "semi-quantitative"; et, au niveau post-traductionnel, par phosphorylation *in vivo* dans une culture cellulaire de tabac BY-2 stimulée par de la forskoline, du dibutyryl-AMPc, de l'acide salicylique ou des oligopectates.

Nous avons pu montrer que le dibutyryl-AMPc, la forskoline et l'acide salicylique induisent une augmentation du taux de transcription du gène CREB 20 minutes après leur addition. Au niveau post-traductionnel, nous avons pu mettre en évidence une phosphorylation de la protéine CREB uniquement dans les cellules traitées à l'acide salicylique.

Ces résultats montrent, d'une part, qu'il existe probablement un lien entre la voie de l'AMPc et le taux de transcription de CREB; et, d'autre part, que cette voie se trouve également sous le contrôle d'un autre messager secondaire, l'acide salicylique.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1999

Promoteur: J. Messiaen

Je tiens à remercier, en premier lieu et tout particulièrement, le professeur Messiaen Johan et le professeur Van Cutsem pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un grand merci à Anabelle pour tes nombreux conseils, ta gentillesse et surtout ta patience tout au long de cette année

Merci aux autres personnes du laboratoire pour leurs sourires, à Cindy, Mallory, Pierre, Nicolas, Miguel, Catherine...

Merci à Caroline et à Romy pour toutes les années d'étude passées ensemble.

Merci à ma famille pour leur soutien moral, mes parents, Thierry et Françoise.

Merci à Patrice, pour ton soutien et ta patience, à Juju, Charles. A Yolande.



## Liste d'abréviations :

A	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
AMPc	3',5'-adénosine monophosphate
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovin serum albumine
BY-2	Bright Yellow-2
C	Cytidine
°C	Degré celsius
CAD	constitutif activation domain
CAP	cAMP activated protein
CBP	CREB binding protein
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
CTAB	Bromure d'hexadécyl-triméthylammonium
CTX	toxine de choléra
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DP	Degré de polymérisation
DTT	Dithiothréitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
G	Guanosine
g	gramme
HPLC	High pressure liquid chromatography
HR	Réponse d'hypersensibilité (hypersensitive response)
HRP	Horse Radish peroxydase
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
kDa	KiloDalton
KID	Kinase inducible domain
L	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
M	Molaire
mA	milliampère
ml	Millilitre
mM	Millimolaire

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Protéine kinase A
PKI	Protein kinase inhibitor
PP	Phosphatase
PR	Pathogenesis related
PTX	Toxine pertussique
PVP	Polyvinyl-pyrrolidone
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	reverse transcriptase polymorphism chain reaction
SABP	Salicylic acid binding protein
SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
T	Thymidine
TAF's	TATA binding protein associated factors
TBS	Tris-buffered Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> , -Tétraméthyl Ethylène Diamine
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Tween	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
U	Unité enzymatique
μl	Microlitre
UV	Ultra-Violet
V	Volt
v/v	Volume/Volume

# TABLES DES MATIERES

## I . INTRODUCTION

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	3
LA VOIE DE L'AMPC CHEZ LES ANIMAUX. ....	4
GÉNÉRALITÉS.....	4
LES COMPOSANTS DE LA VOIE DE L'AMPC.....	4
a). Le complexe ligand-récepteur couplé aux protéines G. ....	4
b). Les protéines G.....	5
c). L'adénylate cyclase (AC).....	7
d). La protéine kinase A.....	8
e). Régulation de la concentration cytosolique en AMPc. ....	9
f). Le facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein).....	10
LA VOIE DE L'AMPC CHEZ LES VÉGÉTAUX. ....	15
GÉNÉRALITÉS.....	15
INTERMÉDIAIRES DE LA VOIE DE L'AMPC.....	16
a). Récepteur.....	16
b). Les protéines G.....	16
c). L'adénylate cyclase.....	17
d). La protéine kinase A.....	18
e). CREB.....	19
RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE L'AMPC CHEZ LES VÉGÉTAUX. ....	19

## II . OBJECTIFS

LES OBJECTIFS.....	21
--------------------	----

## III . MATERIEL ET METHODES

1. MATÉRIEL.....	22
1.1. CULTURE D'E.COLI.....	22
1.2. CULTURE EN SUSPENSION DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> . ....	22
1.3. LES AMORCES.....	23
2. MÉTHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLÉIQUES.....	24
2.1. EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE DE PLANTES. ....	24
2.2 RÉACTION DE PCR. ....	25
2.3. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE D' <i>E. COLI</i> .....	25
2.4. ISOLEMENT D'ARN.....	26
2.5. DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES AU SPECTROPHOTOMÈTRE.....	27
2.6. NORTHERN BLOT.....	28
2.7. RT-PCR.....	32
2.9. GEL D'ÉLECTROPHORÈSE (GEL HORIZONTAL). ....	33
3. MÉTHODES RELATIVES AUX PROTÉINES.....	34
3.1. EXTRACTION DES PROTÉINES VÉGÉTALES.....	34



3.2. ELECTROPHORÈSE SDS-PAGE (MÉTHODE DE LAEMMLI).....	34
3.3. VISUALISATION DES PROTÉINES PAR COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE .....	36
3.4. TRANSFERT DE PROTÉINES D'UN GEL SDS-PAGE SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE. ....	36
3.5. DOT-BLOT ET WESTERN BLOT. ....	37
3.6. PROTOCOLE D'EXTRACTION D'OLIGO DE DP $\geq$ 9 .....	39
4. DÉROULEMENT GÉNÉRAL D'UNE MISE EN ÉVIDENCE TRANSCRIPTIONNELLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION CREB .....	40
5. DÉROULEMENT GÉNÉRAL D'UNE MISE EN ÉVIDENCE POST- TRADUCTIONNEL DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION CREB ( <i>FIGURE 18</i> ).....	41

## IV . RESULTATS ET DISCUSSION

1. RAPPEL DES TRAVAUX ANTÉRIEURS .....	42
2. RAPPEL DES OBJECTIFS DU MÉMOIRE .....	42
3. LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL : LA CULTURE EN SUSPENSION DE CELLULES DE TABAC (SOUCHE BY-2).....	43
4. ANALYSE DES VARIATIONS DU TAUX DE TRANSCRIPTION DE CREB .....	44
4.1 Essai de détection du niveau de transcription de CREB par Northern blot .....	44
4.2 Mise au point de la technique de RT-PCR "semi-quantitative" sur notre matériel .....	47
4.4. Approche pharmacologique.....	50
4.5. Effet d'une simulation de stress sur le taux de transcription de CREB-A. ....	51
4.6. Conclusion générale concernant l'analyse des variations de transcription de CREB. ....	53
5. ETUDE DE L'INDUCTION DE LA PHOSPHORYLATION DU FACTEUR CREB .....	54
5.1 Déroulement de l'expérience .....	54
5.2 Vérification de la spécificité des anticorps contre CREB-A et CREB-B de chicorée ...	55
5.3 Détection du facteur CREB par western blot.....	56
5.4 CREB-A est-il phosphorylé? .....	56

## V . DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	57
--	----

## VI . BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE.....	61
--------------------	----

*I. Introduction.*



## INTRODUCTION GENERALE.

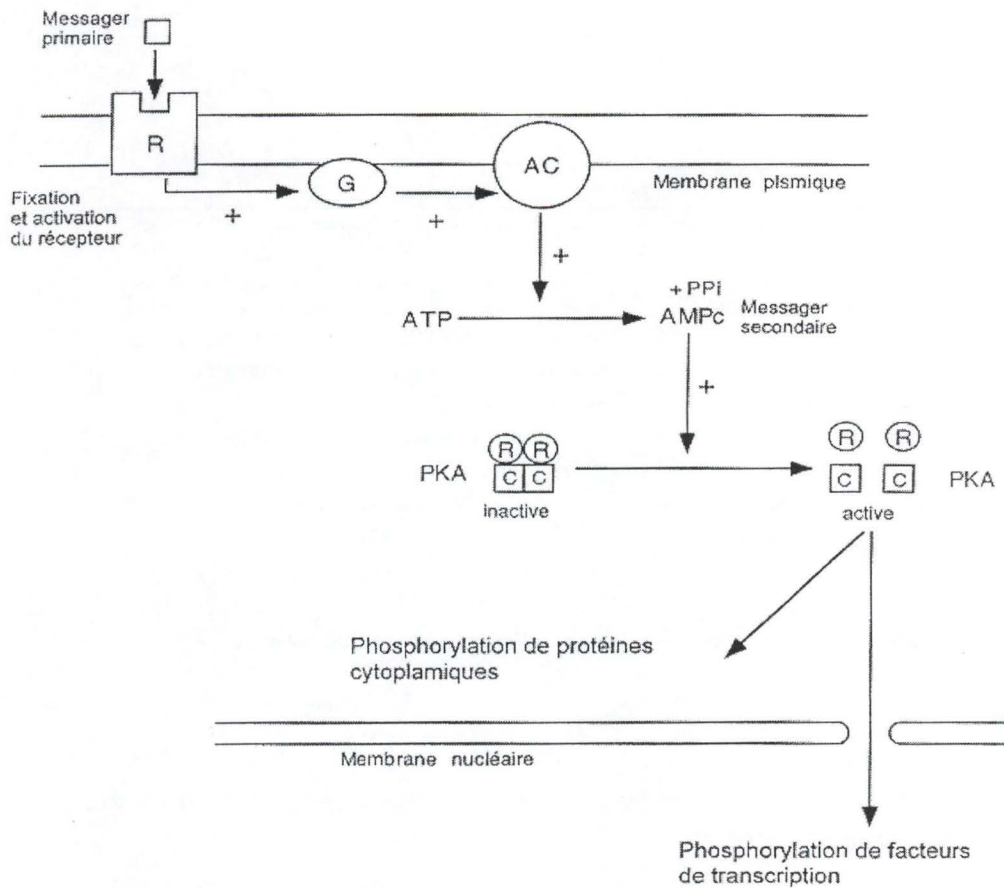
Les végétaux sont confrontés à différentes contraintes imposant des modifications rapides de l'expression de leur génome. Les conditions du milieu sont en effet extrêmement variables : la plante subit des attaques pathogènes (bactéries, champignons, insectes, virus...) dans un environnement aux conditions climatiques très changeantes (chaleur, froid, vent, sécheresse...).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes focalisés sur les interactions plante-pathogène et, plus particulièrement au traitement de l'information par la plante. Cette information, sous la forme de molécules-signal ou éliciteurs est généralement incapable de franchir la membrane plasmique de la cellule. La cellule doit donc transmettre cette information à l'intérieur du cytosol, grâce à des récepteurs spécifiques, pour fournir une réponse physiologique adaptée. Dans le cas d'une attaque pathogène, la perception de l'agresseur par la plante déclenchera l'activation de gènes de défense.

La cellule dispose d'un nombre important de voies de transduction du signal lui permettant de faire face aux différentes contraintes de l'environnement. Parmi celles-ci, la voie de l'AMPC, bien caractérisée chez les cellules animales, constitue encore toujours une énigme chez les cellules végétales (*figure 1*). Messiaen (1994) a montré que des analogues de l'AMPC pouvaient activer (directement ou indirectement) la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), l'enzyme-clé de la synthèse des phytoalexines et de la lignine (deux réponses de défense de la plante). D'autre part, Bellefontaine (1995) a cloné 2 isoformes du facteur de transcription CREB, un intermédiaire dans l'activation des gènes AMPC-dépendants. Draye (1998) a, quant à lui, produit des anticorps anti-CREB qui seront utilisés dans ce mémoire pour étudier les modes d'activation de CREB dans différentes situations de stress.

Avant de passer en revue nos résultats, nous décrivons, brièvement les différents composants de la voie de l'AMPC et les modes de régulation de cette voie chez les cellules animales. Nous terminerons, enfin, par faire le point sur l'état des recherches concernant cette voie chez les végétaux.





**Figure 1 : Voie générale de l'AMPc.**

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

Tissu	Hormone induisant une élévation de l'AMPc	Réponse métabolique
Adipeux	Adrénaline, ACTH, glucagon	Hydrolyse accentuée des triglycérides; baisse de l'entrée d'acides aminés
Hépatique	Adrénaline et noradrénaline; glucagon	Accroît la glycogénolyse et décroît la synthèse de glycogène; accroît l'entrée des acides aminés; accroît la néoglucogénèse à partir d'acides aminés
Follicule ovarien	FSH; LH	Accroît la synthèse d'œstrogènes et de progestérone
Corticosurrénale	ACTH	Accroît la synthèse d'aldostérone, de cortisol
Myocytes du cœur	Adrénaline	Accroît le rythme cardiaque
Thyroïde	TSH	Sécrétion de thyroxine
Cellules osseuses	Hormone parathyroïde	Accroît la résorption du calcium osseux
Muscle squelettique	Adrénaline	Conversion de glycogène en glucose
Intestin	Adrénaline	Sécrétion des sucs intestinaux
Rein	Vasopressine	Réabsorption de l'eau
Plaquettes du sang	Prostaglandine 1	Inhibition de l'agrégation et de la sécrétion

**Figure 2 : Quelques réponses métaboliques à une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire.**

En s'attachant à leur récepteur, beaucoup d'hormones entraînent un accroissement du taux d'AMPc et des réponses métaboliques propres à chaque tissu sensible (Lodish *et al.*, 1997)

# LA VOIE DE L'AMPC CHEZ LES ANIMAUX.

## Généralités.

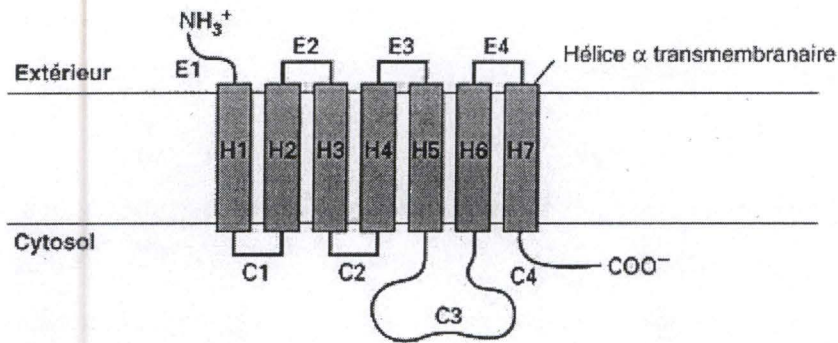
L'AMPC est un messager secondaire contrôlant de nombreux processus physiologiques chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les procaryotes, l'AMPC intervient dans le métabolisme du glucose. On observe, en effet, une corrélation entre la concentration en AMPC et la situation nutritionnelle des cellules. Chez *E.coli*, si le milieu contient du glucose, la concentration en AMPC est faible. Lorsque le glucose vient à disparaître et que d'autres sources de carbone sont présentes (lactose, maltose, arabinose), la concentration en AMPC augmente considérablement. L'AMPC s'associe alors avec la protéine CAP (cAMP activated protein) et l'active. La CAP peut ainsi contrôler l'expression des gènes nécessaire à la dégradation de ces nouvelles sources de carbone. L'AMPC ne doit cependant pas être considéré comme un "signal universel" de la faim. Chez *Pseudomonas* par exemple, la concentration en AMPC est indépendante de la source de carbone (Gancedo *et al.*, 1995).

Chez les eucaryotes, l'AMPC possède une toute autre fonction : il est un messager secondaire c-à-d qu'il est un relais entre un récepteur membranaire et une ou plusieurs voies de transduction du signal. Chez les cellules animales par exemple, l'AMPC régule la transmission synaptique, la régulation de canaux ioniques, la dégradation du glycogène dans le foie, la sécrétion d'hormones... (Rawn, 1990 ; Berridge, 1995 ; Mulligan *et al.*, 1999).

## Les composants de la voie de l'AMPC.

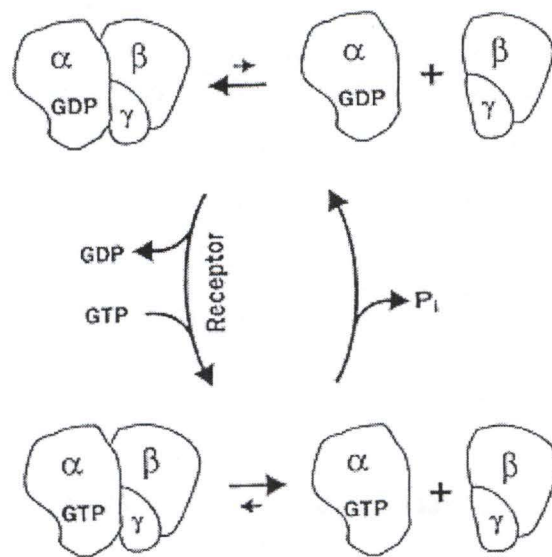
### a). Le complexe ligand-récepteur couplé aux protéines G.

Les molécules ou stimulus physique pouvant activer la voie de l'AMPC sont nombreux et très diversifiés : hormones, facteurs de croissance, neuropeptides ou photons... (Barritt, 1994 ; Clapham, 1993) (*figure 2*). L'activation de la voie de l'AMPC fait intervenir des récepteurs couplés à des protéines G. Ces protéines sont insérées dans la membrane plasmique grâce à 7 domaines transmembranaires



**Figure 3 : Structure du récepteur à 7 domaines transmembranaires.**

Disposition schématique des segments d'une chaîne de récepteur liée à une protéine G comportant 7 replis transmembranaires.



**Figure 4 : Le modèle d'activation des protéines G.**

L'état fonctionnel de la protéine G est déterminé par son lien nucléotidique. Avec du GDP, la protéine G est inactive. Quand elle lie le GTP, la protéine G est activée et l'affinité entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  diminue. Les récepteurs stimulent les protéines G par l'échange catalytique du GDP en GTP (Sternweis *et al.*, 1992).



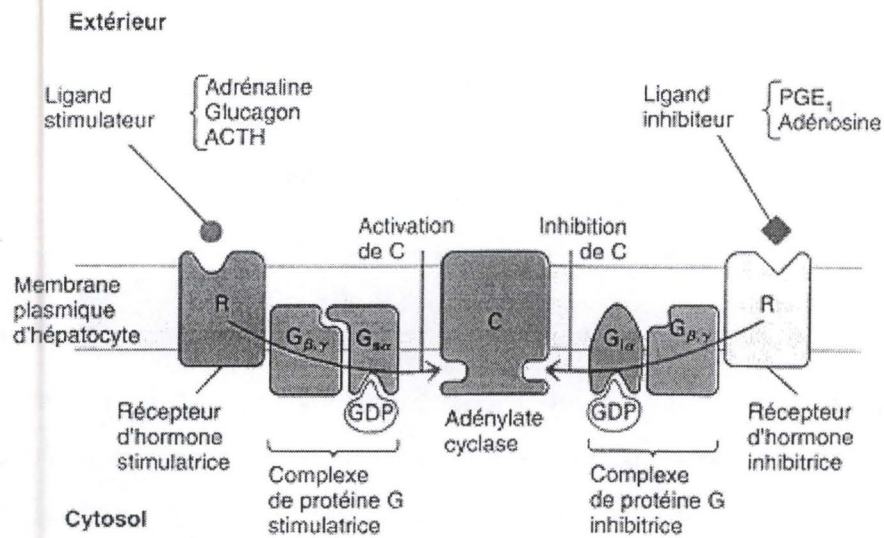
contenant chacun environ 20 acides aminés hydrophobes formant une hélice  $\alpha$  (Lambright *et al.*, 1996). La face extracellulaire du récepteur fixe le ligand grâce à une poche hydrophobe résultant de l'arrangement des 7 peptides transmembranaires (*figure 3*). La face cytoplasmique permet, quant à elle, l'activation d'une protéine effectrice si et seulement si le complexe ligand-récepteur se forme. Des expériences menées sur des protéines chimériques ont prouvé que la troisième boucle cytoplasmique et la partie C-terminale de la protéine G sont impliquées dans le couplage récepteur-protéine G (Hibert *et al.*, 1993 ; Spiegel *et al.*, 1991).

La régulation de l'activité de tels récepteurs se réalise par l'internalisation des complexes récepteur-ligand, la désensibilisation du récepteur par phosphorylation et/ou le cross-talking avec d'autres voies de transduction du signal (Houslay *et al.*, 1997).

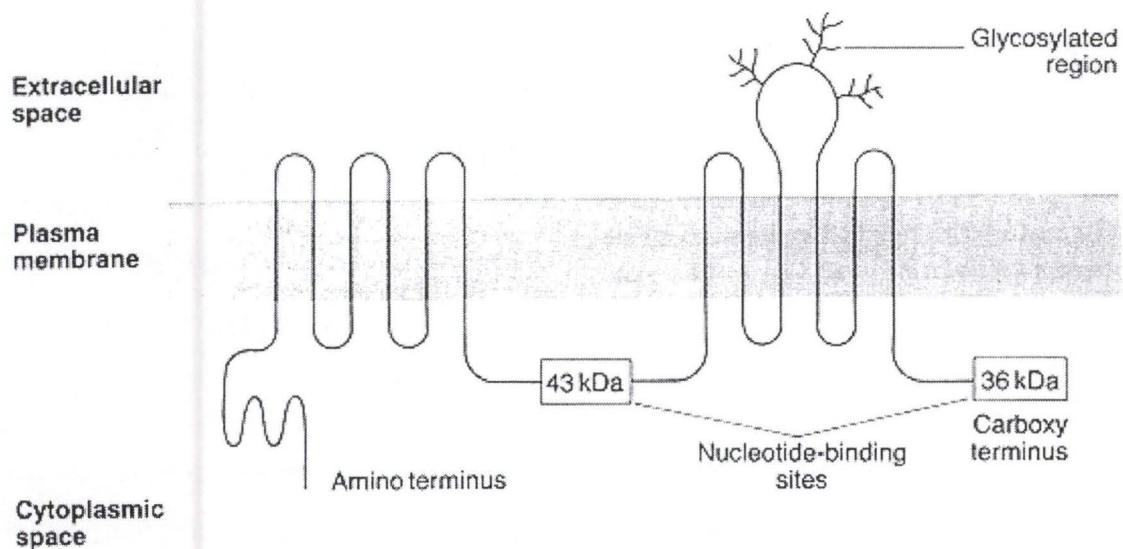
## **b). Les protéines G**

Les protéines G hétérotrimériques sont des complexes constitués de 3 sous-unités :  $\alpha$  (39 à 52 KDa),  $\beta$  (35 à 36 KDa), et  $\gamma$  (7 à 10 KDa) (Kaziro *et al.*, 1991). Elles sont ancrées à la face interne de la membrane cytoplasmique et lient le GTP. Les protéines G font partie d'une famille multigénique (plus de 1000 protéines G) composée d'au moins 16 gènes différents codant pour la sous-unité  $\gamma$ , 6 pour la sous-unité  $\beta$  et de nombreux gènes pour la sous-unité  $\alpha$ . La distinction entre les différentes protéines G provient surtout de la variabilité au sein de la sous-unité  $\alpha$  (le complexe  $\beta\gamma$  est généralement bien conservé entre les différentes protéines G) (Linder *et al.*, 1994 ; Simon *et al.*, 1991).

A l'état inactif, la protéine G est constituée des 3 sous-unités parmi lesquelles la sous-unité  $\alpha$  lie le GDP (*figure 4*). Lorsqu'un ligand se fixe sur un récepteur, celui-ci change de conformation et interagit avec la protéine G. Le GDP de la sous-unité  $\alpha$  est remplacé par du GTP (Linder *et al.*, 1994). La protéine G ainsi activée se dissocie en 2 parties : la sous-unité  $\alpha$  avec le GTP et le complexe  $\beta\gamma$ , deux entités ayant chacune une fonction signalétique (Clapham, 1996).



**Figure 5 : L'activation (G<sub>s</sub>) et l'inactivation (G<sub>i</sub>) hormono-induites de l'adénylate cyclase (Lodish *et al.*, 1997).**



**Figure 6 : Structure tertiaire de l'adénylate cyclase.**

L'adénylate cyclase est un polypeptide contenant 2 domaines hydrophobes séparés par un large domaine hydrophile localisé dans l'espace cytoplasmique. Un deuxième domaine hydrophile est localisé du côté C-terminal de la molécule (Barritt, 1994).



La sous-unité  $\alpha$  possède une activité GTPasique intrinsèque hydrolysant le GTP en GDP + Pi. La sous-unité  $\alpha$  s'inactive donc progressivement et se réassocie au complexe  $\beta\gamma$  reconstituant la protéine G de départ (Kaziro *et al.*, 1991).

Le complexe  $\beta\gamma$  quant à lui est capable de stabiliser l'interaction de la sous-unité  $\alpha$  avec le récepteur, de moduler les effets de la sous-unité  $\alpha$  en diminuant le taux de dissociation du GTP, et de réguler indirectement l'activité de canaux ioniques et de phospholipases (Iñiguez-Lluhi *et al.*, 1993).

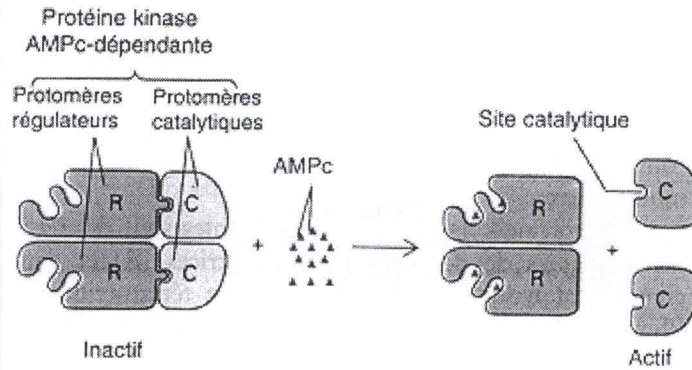
La protéine G est ancrée dans la membrane plasmique via la sous-unité  $\alpha$  myristoylée grâce à un lien amide avec une glycine de la région N-terminale, et, via la sous-unité  $\gamma$  géranylgeranylée grâce à un lien thioester avec une cystéine de la région C-terminale (spiegel *et al.*, 1991).

Les protéines G activatrices (Gs) et les protéines G inhibitrices (Gi) régulent de manière différentielle l'activité de l'adénylate cyclase et le taux en AMPc cellulaire (Schoilch *et al.*, 1999 ; Simonds *et al.*, 1999) (**figure 5**). Il existe différentes Gs : les Gs  $1\alpha$  sont généralement exprimées dans tous les tissus et les Gs  $2\alpha$  sont spécifiques des neurones sensoriels olfactifs et sont parfois couramment appelés Golf. Il en est de même pour les Gi : Gi  $2\alpha$  et Gi  $3\alpha$  sont exprimées dans tous les tissus et Gi  $1\alpha$  sont spécifiques des tissus du cerveau (Kaziro *et al.*, 1993).

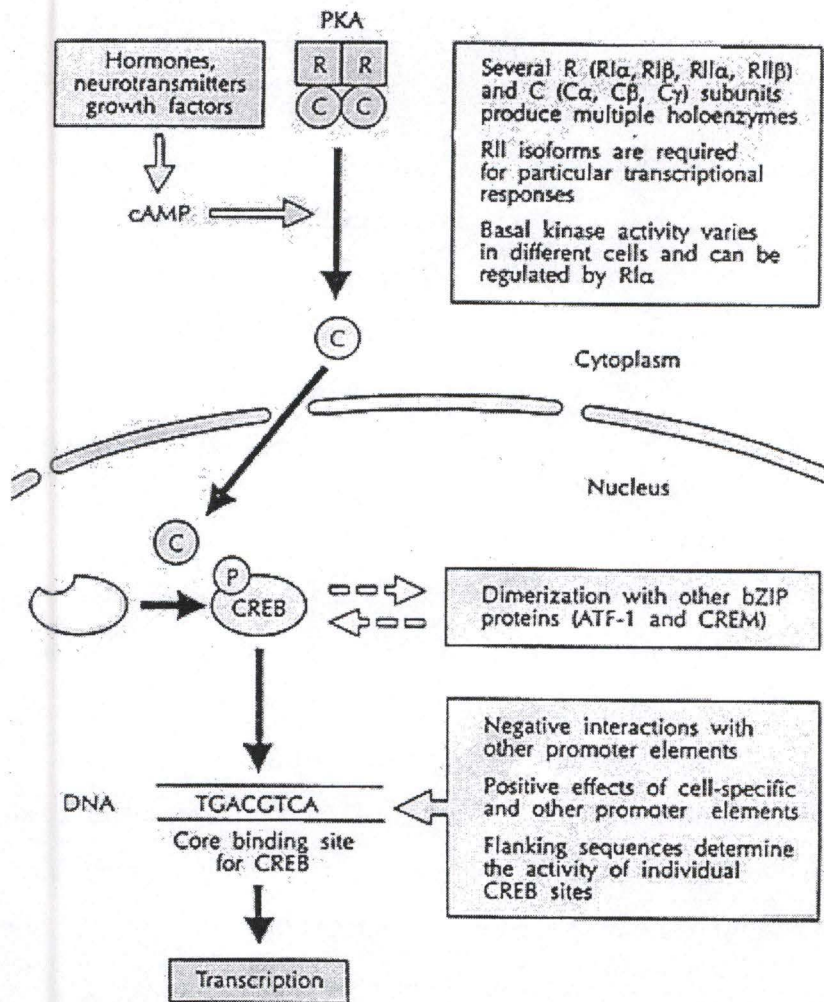
L'utilisation de toxines et autres modulateurs ont permis de mieux comprendre le rôle des protéines G. La toxine pertussique (PTX) empêche les protéines G de se lier à leur récepteur par ADP-ribosylation (Armstrong *et al.*, 1992). Ce mécanisme consiste à transférer un groupe ADP-ribose provenant du NAD<sup>+</sup> sur un résidu arginine de la sous-unité  $\alpha$  (Burgering *et al.*, 1995). La toxine du choléra (CTX) quant à elle, active les protéines G de manière irréversible en inhibant l'activité GTPase des sous-unité  $\alpha$ . Le mastoparan, un peptide extrait de venin de guêpe, active les protéines G en stimulant la région du récepteur activé.

### **c). L'adénylate cyclase (AC).**

L'adénylate cyclase est une enzyme membranaire qui catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP (**figure 6**). Cette enzyme est activée par la sous-unité  $\alpha$ -GTP



**Figure 7 : Structure tétramérique de la PKA.** La fixation de 2 AMPc sur chaque sous-unité régulatrice provoque la libération des sous-unités catalytiques (Lodish, 1997).



**Figure 8 : Activation du facteur CREB par la PKA.** Une augmentation de la concentration en AMPc a comme conséquence une dissociation des sous-unités catalytiques et régulatrices de la PKA. La sous-unité catalytique migre dans le noyau et active CREB par phosphorylation. CREB active la transcription de gènes dépendants de l'AMPc (Lee, 1991).



de la protéine G, transforme l'ATP en AMPc et entraîne une élévation de la concentration en AMPc jusqu'à 4 fois par rapport à sa concentration initiale dans une cellule non stimulée (Barritt, 1992). L'activité de l'AC peut également être contrôlée de manière directe ou indirecte par le complexe  $\beta\gamma$ . Par exemple, l'addition de  $\beta\gamma$  provoque une diminution de l'activité de l'AC de type I (Choi *et al.*, 1993).

Il existe différentes formes d'AC (Sunahara RK *et al.*, 1996). Six AC différentes ont été isolées à partir de cerveau bovin. Elles présentent des régions homologues et des régions hypervariables distinguant chaque enzyme. Sur base de l'homologie de séquence, ces AC sont classées en 4 catégories : la première catégorie comprend l'AC de type I ; la deuxième contient l'AC III ; la troisième, l'AC II et IV ; et, la dernière catégorie l'AC V et VI. L'AC de type I est spécifique du cerveau (Choi *et al.*, 1993). Récemment, des études de clonage sont parvenues à isoler 10 AC mammaliennes, toutes activées par les protéines G (Sunahara *et al.*, 1996).

L'existence d'une telle diversité, au sein de la famille des AC complique considérablement l'étude de ces enzymes. Bien plus, un récepteur peut être couplé à plusieurs effecteurs et plusieurs récepteurs peuvent activer un même effecteur. Ce schéma se complique encore par l'existence de phénomène de cross-talking avec d'autres voies de transduction du signal.

Les principales molécules utilisées pour étudier l'activité de l'AC sont la forskoline (un activateur) et des composés mimant l'ATP et bloquant le site actif de l'enzyme (2'3'-didéoxyadénosine) (De Jonge, 1996).

#### **d). La protéine kinase A.**

La PKA est un tétramère constitué de 2 sous-unités régulatrices et de 2 sous-unités catalytiques. Elle est activée directement par l'AMPc : 2 AMPc se fixent sur chacune des sous-unité régulatrice provoquant un changement de conformation qui libère les 2 sous-unités catalytiques (*figure 7*). Celles-ci activent des enzymes ou migrent dans le noyau pour y activer des facteurs de transcription (Darnell *et al.*, 1988, Rawn, 1990) (*figure 8*). Dans la plupart des cas, les sous-unités régulatrices ne serviraient qu'à inhiber l'action des sous-unités catalytiques en absence d'AMPc (Taylor *et al.*, 1993).

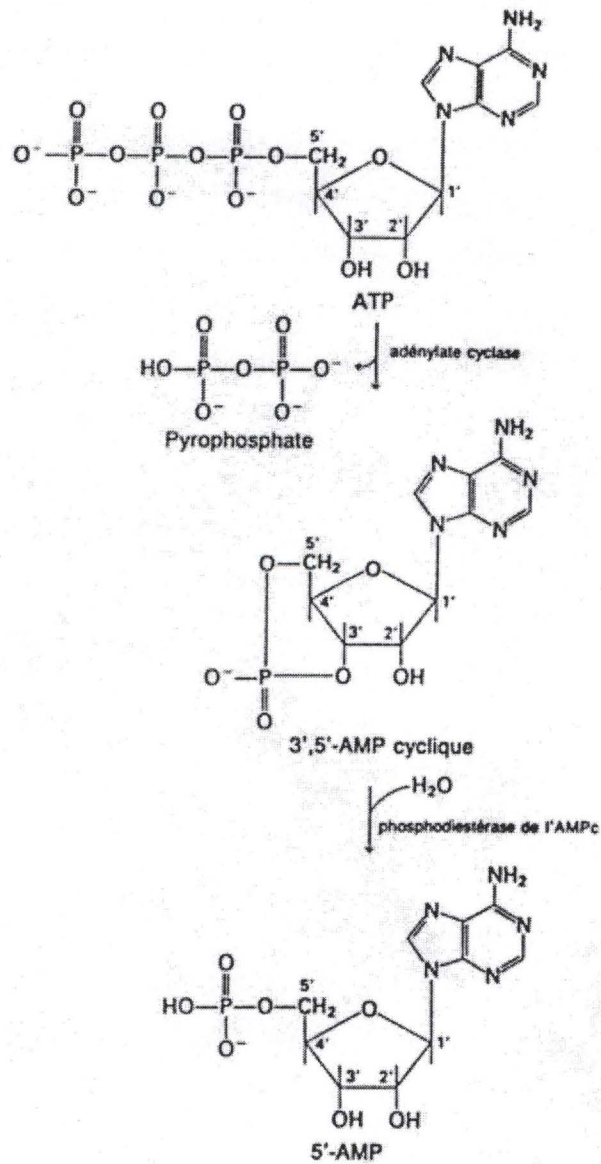


Figure 9 : Synthèse et dégradation de l'AMPc (Lodish *et al.* , 1997).

La PKA est une serine/thréonine kinase dont il existe deux formes : la PKA I et la PKA II. Ces deux enzymes ont les mêmes sous-unités catalytiques, mais des sous-unités régulatrices différentes (RI et RII) (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Il existe également plusieurs isoformes de sous-unités régulatrices (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) et des sous-unités catalytiques (C $\alpha$  et C $\beta$ ) selon le type de cellule ou l'organisme. En général, les sous-unités RI $\alpha$ , RII $\alpha$  et C $\alpha$  sont exprimées dans la plupart des tissus, tandis que les sous-unités C $\beta$ , RI $\beta$ , et RII $\beta$  se retrouvent essentiellement au niveau du cerveau (Mc Knight *et al.*, 1988).

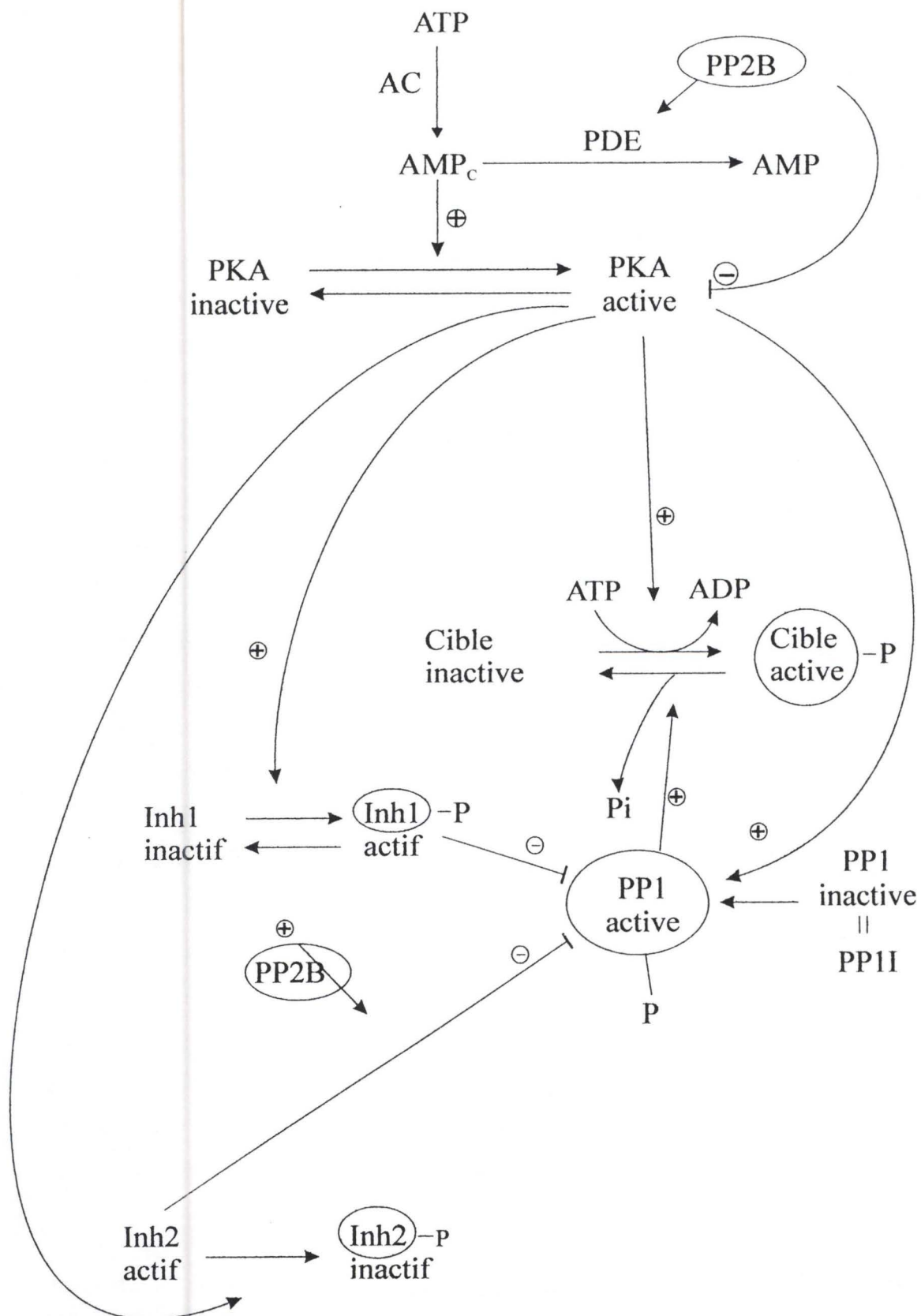
Les différentes sous-unités régulatrices ont, comme les sous-unités catalytiques, plusieurs rôles physiologiques. La sous-unité RI $\alpha$  présente dans les cellules fœtales permet d'obtenir une faible transcription de gènes régulés par CREB en absence d'AMPc (Lee, 1991). La sous-unité RII quant à elle possède une activité topoisomérase, c-à-d qu'elle possède la capacité de modifier le degré de super-enroulement de l'ADN. Cette activité n'est observée que si la sous-unité RII est activée par phosphorylation par une sous-unité catalytique (Suzuki *et al.*, 1990). De plus, si le taux de sous-unités régulatrices est supérieur au taux de sous-unités catalytiques, il n'y a pas activation de facteur de transcription sans AMPc ; ceci afin de garder un taux faible en PKA dans une cellule ne subissant aucune stimulation (Mc Knight, 1988). Enfin, la transfection de cellules mutantes, insensibles à l'AMPc, par le gène de la sous-unité RII de la PKA, inséré dans un vecteur d'expression, restaure la capacité d'induire le gène de la somatostatine dépendant de l'AMPc après stimulation par la forskoline.

#### **e). Régulation de la concentration cytosolique en AMPc.**

Comme nous venons de le voir, le contrôle du taux d'AMPc intracellulaire peut déjà avoir lieu via une régulation de l'AC. En aval de la production d'AMPc, la concentration en AMPc est contrôlée principalement par des phosphodiesterases (PDE) et des phosphatases.

Les PDE hydrolysent le lien ester en position 3' du 3',5'-AMPc et diminuent donc la concentration en AMPc intracellulaire (*figure 9*). Comme pour l'AC, il existe différentes formes de PDE (AMPc spécifiques, GMPc spécifiques, et les AMPc et





**Figure 10 : Schéma général de la régulation de la voie de l'AMPc par les phosphatases.**  
 Les PP-1 déphosphorylent des protéines activées par la voie de l'AMPc. L'activité de la PP-1 est régulée simultanément par la PKA et par l'inhibiteur 1 et 2. L'activité de la PKA et des PDE se trouve également sous le contrôle de la PP-2B.



GMPc spécifiques) faisant partie d'une grande famille multigénique. Ces enzymes sont également régulées de manière différentielle ( $\text{Ca}^{++}$ , calmoduline, phosphorylation,...) (Houslay *et al.*, 1997).

Les phosphatases, quant à elles, déphosphorylent les protéines phosphorylées soit sur des résidus sérine/thréonine, soit sur des résidus tyrosine. Dans la classe des sérine/thréonine phosphatases, les phosphatases de type 1 (PP-1) et de type 2 B (PP-2B) agissent au niveau de la voie de l'AMPc (MacKintosh, *et al.*, 1994) (*figure 10*). La PP-1 est un homodimère composé d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Il en existe différentes isoformes variant seulement au niveau des sous-unités régulatrices. La PP-1 déphosphoryle des protéines activées par la voie de l'AMPc. L'AMPc régule également l'activité de la PP-1 en activant, via la PKA, un inhibiteur-1 qui diminue l'activité des PP-1. La PP-2B est un hétérodimère composé de sous-unités désignées A et B. Ceux-ci possèdent un poids moléculaire de 61 et de 19 KDa, respectivement. La sous-unité A contient le site catalytique et le site de liaison à la calmoduline, alors que la sous-unité B contient le site de liaison au  $\text{Ca}^{++}$ . PP-2B régule les activités de protéines kinases et d'autres phosphoprotéines phosphatases comme les PDE (Barritt, 1994).

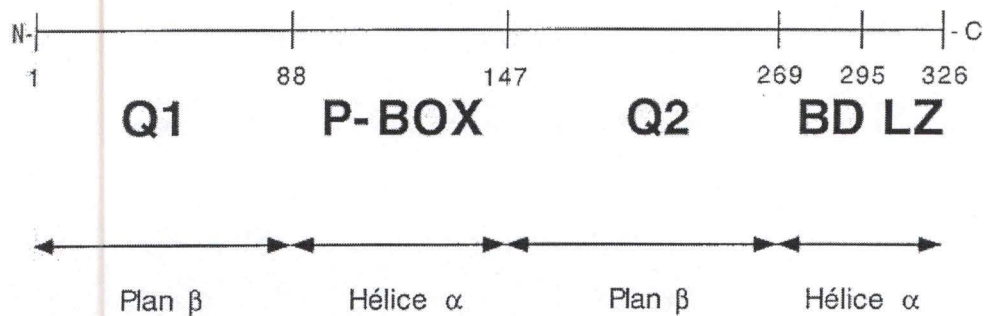
## **f). Le facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein).**

### **Généralités.**

En 1987, Montminy *et al.* découvrirent pour la première fois CREB, une protéine transactivatrice de 43 KDa purifiée à partir de cellules hypothalamiques de rat. Plusieurs protéines homologues à CREB ont été découvertes par la suite. Elles modulent positivement ou négativement la transcription de gènes dépendants de l'AMPc.

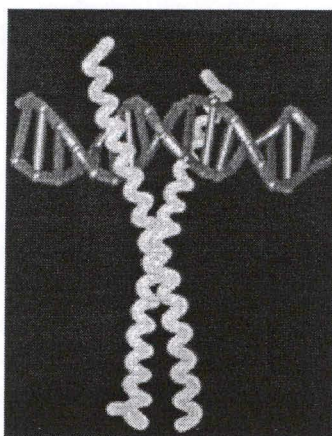
CREB appartient à la superfamille des protéines b-ZIP contenant un domaine basique et un domaine contenant 4 leucines (1 leucine tous les 7 acides aminés) (Ferrerri *et al.*, 1994).

Chez les animaux, CREB contrôle des réponses physiologiques aussi diversifiées que les réponses comportementales face à divers stress, l'acquisition

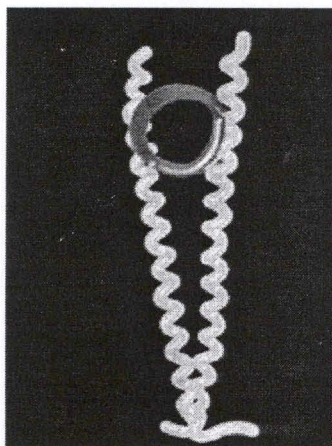


**Figure 11 : Structure du facteur de transcription CREB.**

A.



B.



**Figure 12 : Fixation d'une protéine leucine zipper au niveau de l'ADN.**

En A : fixation de la protéine au niveau du grand sillon de l'ADN. En B : interaction entre les acides aminés basiques, chargés positivement, avec les charges négatives des phosphates de l'ADN (Lodish *et al.*, 1997).

d'une mémoire à long terme, le contrôle du rythme circadien locomoteur ou l'activation des cellules de Schwann lors de la stimulation nerveuse (Impey S *et al.*, 1998 ; Lee MM *et al.*, 1999 ; Belvin *et al.*, 1999).

### **Structure de CREB.**

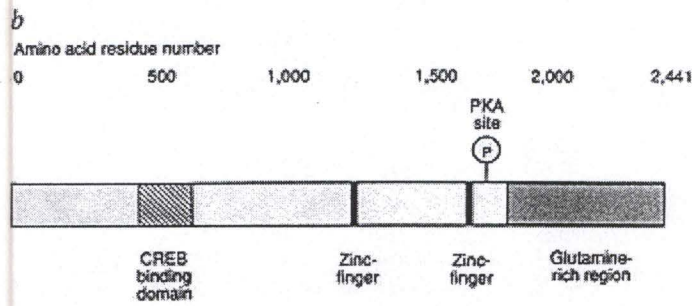
La protéine CREB (43 KDa) est composée de 4 parties : un domaine N-terminal riche en glutamine, un domaine phospho-accepteur ou « P-box », un domaine de liaison au grand sillon de l'ADN riche en acides aminés basiques et un domaine C-terminal « leucine zipper » (Montminy *et al.*, 1987) (*figure 11*).

Le domaine N-terminal comprend 2 domaines transactivateurs riches en glutamine, Q1 et Q2. Ils forment des feuilletts  $\beta$  capables d'interagir et d'activer la machinerie transcriptionnelle (Lee, 1991 ; Lalli, 1994 ; Quinn, 1993). Le domaine « P-box » ou phospho-accepteur comprend une région de  $\pm 50$  acides aminés appelés KID (Kinase Inducible Domain). Ce domaine contient la sérine-133 dont la phosphorylation par la PKA est indispensable à l'activation de CREB (Parker *et al.*, 1996). D'autres protéines comme la protéine kinase C (PKC), le glycogène synthase kinase III et la caséine kinase I et II (Fiol *et al.*, 1994) peuvent également phosphoryler CREB sur d'autres sites phospho-accepteurs. La phosphorylation de la serine-133 induit un changement de conformation de la protéine exposant ainsi les régions Q1 et Q2 favorable à l'activation de la transcription des gènes dépendants de l'AMPc.

Le domaine basique riche en acides aminés basiques (dont 50% de lysine et d'arginine) tous les 3 ou 4 acides aminés neutralise les charges négatives de l'ADN et interagit avec le grand sillon de l'ADN en se fixant sur une région palindromique CRE (cAMP responsive element) conservée (5'-TGACGTCA-3') située à proximité des gènes dont la transcription dépend de l'AMPc (*figure 12*).

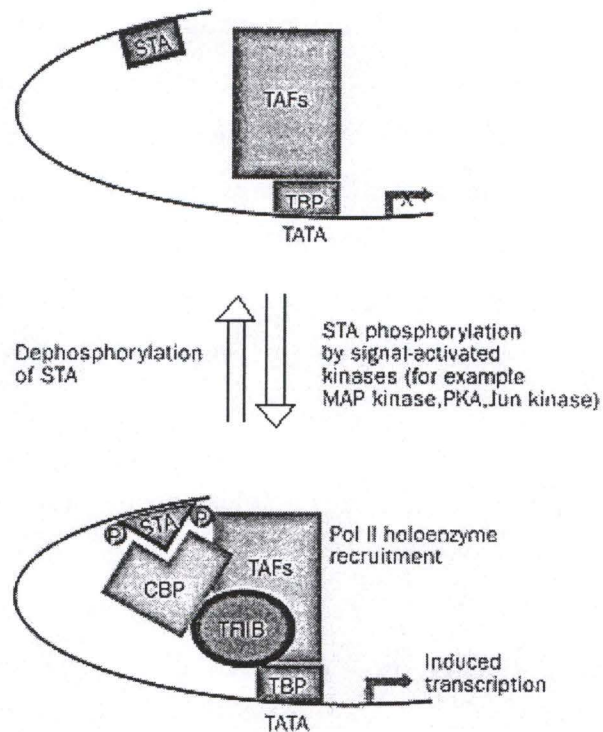
Le domaine C-terminal contient un motif «leucine zipper» comprenant 4 leucines séparées l'une de l'autre par 7 acides aminés (Hoeffler *et al.*, 1988 ; Lalli *et al.*, 1994). Ce domaine est indispensable à la dimérisation de CREB. Deux CREB dimérisés forment une super-hélice appelée «coiled-coil» composée des deux domaines leucine zipper formant une hélice  $\alpha$  amphipatique. L'analyse de la structure





**Figure 13 : La protéine CBP.**

Les positions relatives du domaine de liaison à CREB, les doigts de Zn, le site de phosphorylation de la PKA et la région glutamine de CBP sont montrés sur ce schéma.



**Figure 14 : CREB doit interagir avec d'autres protéines pour initier la transcription.**

Interaction de CREB et de la protéine CBP avec la machinerie de transcription (Nordheim, 1994).

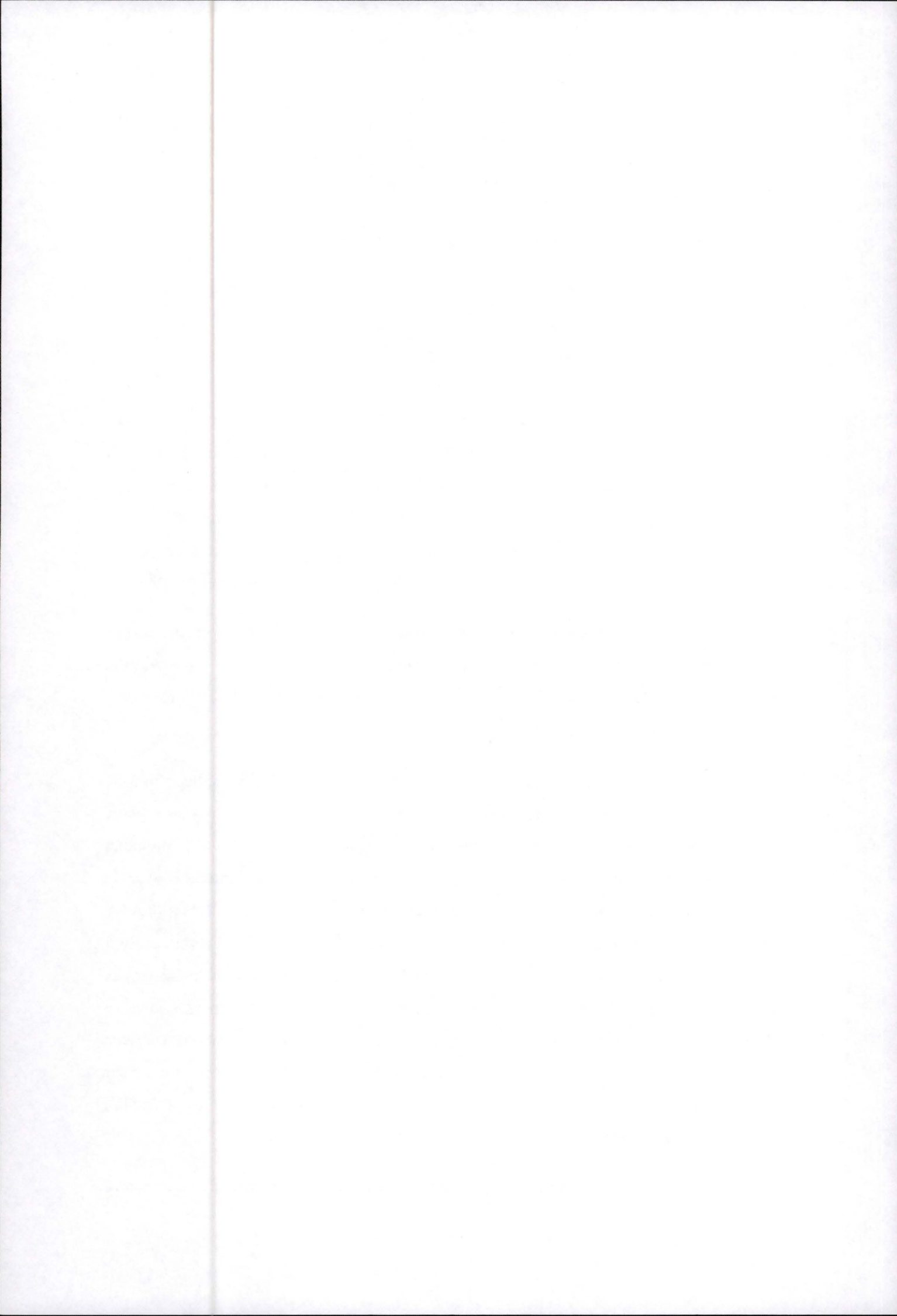
cristallographique du «coiled-coil » montre que la formation de ponts hydrogène entre résidus proches des leucines et le caractère hydrophobe des chaînes latérales des 2 hélices  $\alpha$  permettent de stabiliser le dimère CREB.

### **CREB doit interagir avec d'autres protéines pour initier la transcription.**

Le facteur de transcription CREB seul n'active pas la transcription des gènes dépendants de l'AMPC. CREB interagit, entre autre, avec la protéine CBP (CREB binding protein ). Cette protéine de 250 KDa à 265 KDa contient plusieurs sites de phosphorylation pour la calmoduline kinase II, un site de phosphorylation pour la PKA, 2 régions homologues aux doigts de Zn et un domaine C-terminal riche en glutamine (Chrivia *et al.* , 1993) (*figure 13*). CBP permet de relier directement la «P-box » de CREB-Avec la machinerie transcriptionnelle basale via le facteur TFIIB. L'association de CREB-Avec CBP permet donc le recrutement correct de l'ARN polymérase II et le positionnement adéquat du complexe de transcription sur le promoteur des gènes dépendants de l'AMPC ( Nordheim *et al.*, 1994) (*figure 14*).

Des études *in vivo* récentes sur l'interaction de CREB-Avec le promoteur suggèrent que CREB est lié constitutivement au promoteur et que sa phosphorylation entraîne le recrutement de CBP pour former le complexe CREB/CBP/promoteur (Wolfl *et al.*, 1999).

La situation est davantage compliquée par le fait que CREB médie, à la fois, la transcription basale et la transcription inductible par la PKA via 2 domaines séparés et indépendamment activés : le domaine d'activation constitutif (CAD) et le domaine inductible par la kinase, respectivement. Le domaine CREB CAD interagit avec le facteur TFIID de la machinerie transcriptionnelle via un ou plusieurs TAFs (TATA binding protein associated factors) dont TAF110. Le domaine CAD est composé de 3 sous-domaines comprenant chacun plusieurs sérines, des acides aminés hydrophobes et des glutamines. L'étude de mutants délétés du domaine CAD montre que ce domaine crée un environnement favorable pour une interaction spécifique avec TAF110. Cette interaction favorise le recrutement et/ou la stabilisation du facteur TFIID liant le promoteur, et facilite l'assemblage du complexe de pré-initiation (Felinski *et al.*, 1999).





## Moyens de régulation de CREB

### Régulation de CREB par phosphorylation/déphosphorylation.

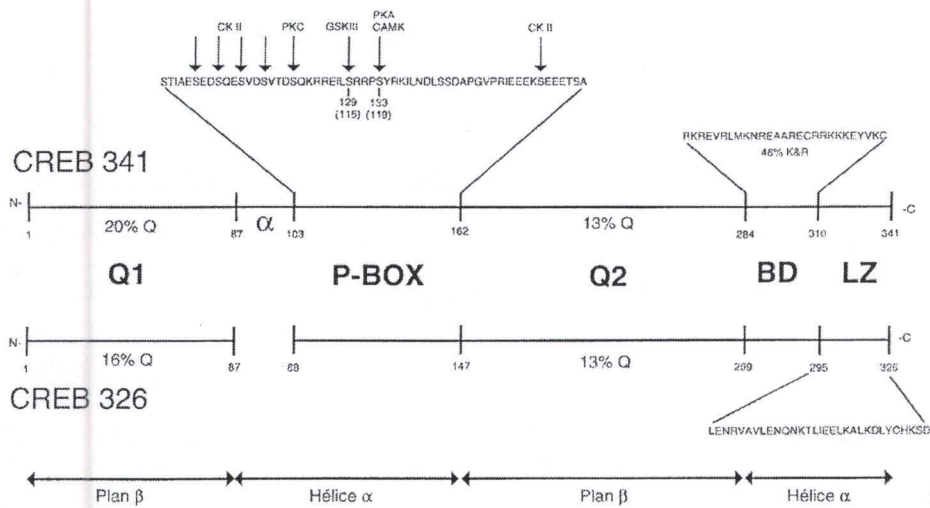
La forme inactive de CREB peut se lier spécifiquement à l'ADN au niveau des sites CREs contenu dans les promoteurs de gènes dépendants de l'AMPc. L'activation de ces gènes n'aura lieu que si CREB est phosphorylé au niveau de la sérine 133. Des mutants Ser133 → Asp sont, en effet, incapable d'assurer la fonction de transactivation. La phosphorylation provoque un changement conformationnel exposant des régions de CREB indispensables pour l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle.

CREB peut également subir des phosphorylations successives dans un ordre bien précis impliquant des kinases primaires et secondaires. Ces phosphorylations multiples permettent de moduler l'activation de CREB (Fiol *et al.*, 1994).

D'autres voies de transduction du signal régulent également CREB (kinases Ca<sup>++</sup>-calmoduline dépendantes, par exemple). Ce cross-talking permet une régulation très précise de l'activité de CREB.

### Hétérodimérisation.

Les protéines b-ZIP possèdent toutes un domaine basique et un motif leucine zipper permettant la dimérisation. Cette dimérisation n'impose cependant pas la formation d'homodimère, c-à-d que des protéines b-ZIP différentes peuvent s'associer pour former un dimère non fonctionnel. Cette hétérodimérisation constitue un moyen de régulation important de l'activité CREB (Lalli *et al.*, 1994). Les principales protéines pouvant ainsi interagir avec CREB sont CREM, Fos et Jun. Dans le cas des facteurs de transcription Fos/Jun, qui ne sont pas activés par l'AMPc, il est intéressant de signaler que le motif TRE (TPA-responsive element, 5'-TGACTCA-3') reconnu au niveau de l'ADN par ces facteurs ressemble étrangement au motif CRE : 5'-TGACGTCA-3'. On peut donc comprendre aisément la facilité avec laquelle ces protéines forment des hétérodimères avec CREB.



**Figure 15 : Structure des deux isoformes du facteur de transcription CREB comportant 341 et 326 acides aminés.**

Les domaines P-box, BD (basic domain) et LZ (leucine-zipper) sont identiques chez les deux isoformes (Berkowitz *et al.*, 1990).

### **L'épissage alternatif.**

L'étude la transcription du gène codant pour le facteur CREB s'est complexifiée depuis la découverte de l'épissage alternatif. Un transcrit primaire peut, en effet, donner plusieurs protéines CREB différentes. Deux formes de CREB, CREB-A de 327 acides aminés découverte dans les cellules placentaires humaines et CREB-B de 341 acides aminés ont été trouvées dans les cellules de cerveau de rat (*figure 15*). La seule différence entre CREB-A et CREB-B réside dans le fait que CREB-B possède 14 acides aminés en plus entre les positions 88 et 102. Ces 2 protéines seraient issues d'un seul ARNm ayant subi un épissage alternatif. Il est intéressant de remarquer que CREB-B possède au niveau de ces 14 acides aminés supplémentaires, 3 résidus sérines et un résidu thréonine autorisant de nouvelles phosphorylations à l'extérieur de la "P-box" (Berkowitz *et al.*, 1990).

Les régulateurs de CREB, CREM (cAMP responsive element binding modulator), subissent également l'épissage alternatif donnant 3 isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Ces répresseurs sont exprimés de manière constitutive. Les CREM régulent la voie de l'AMPc en dimérisant avec CREB. Les complexes CREB/CREM possèdent la spécificité de liaison pour CRE mais ont perdu la fonction transactivatrice. Cette dimérisation induit donc une inhibition de la transcription des gènes dépendants de l'AMPc. Lalli *et al.* en 1994, ont découverts de nouveaux CREM dont l'expression est induite par la voie de l'AMPc. Ces CREM appelés ICER's (inducible cAMP early repressor's) régulent également la voie de l'AMPc en formant des dimères inactifs avec CREB. En effet, CREM ne possède pas la « P-box » ni de domaine riche en glutamine.



## LA VOIE DE L'AMPC CHEZ LES VEGETAUX.

### Généralités.

L'existence de la voie de l'AMPC chez les végétaux a été, et est toujours, contestée par la communauté scientifique. Il a d'abord été nécessaire de prouver l'existence de l'AMPC lui-même. Ce sont des analyses par HPLC, spectrométrie de masse et des essais biologiques (Bolwell *et al.*, 1995) qui ont permis de montrer clairement que les cellules végétales contenaient de l'AMPC.

Le deuxième problème rencontré dans l'étude de l'AMPC a été son dosage exact. Les cellules végétales contiennent, en effet, de nombreuses PDE et les techniques de dosage ne permettaient pas à l'époque de faire la distinction entre le 2' :3'AMPC et le 3':5'AMPC. Les techniques d'homogénéisation des tissus utilisées ne tenaient pas compte ni d'une éventuelle spécialisation cellulaire, ni d'une dilution importante de l'AMPC lors de l'extraction (une cellule végétale contient une vacuole occupant 90 % du volume cellulaire). C'est ainsi que les concentrations en AMPC des cellules végétales rapportées dans la littérature variaient entre le nM et le  $\mu$ M ( $\mu$ M chez les cellules animales) (Assman *et al.*, 1995). Récemment, une méthode basée sur la purification par immunoaffinité et l'analyse par électrospray couplé au spectre de masse, a permis de doser de manière précise l'AMPC chez les végétaux (Ehsan *et al.*, 1998).

Lorsqu'on est enfin arrivé à doser correctement l'AMPC, il fallait trouver les intermédiaires d'une éventuelle voie de transduction du signal activée par l'AMPC. Aujourd'hui, quelques uns de ces intermédiaires sont identifiés, mais il est encore trop tôt pour pouvoir élaborer un schéma cohérent de transduction du signal médié par l'AMPC.

## Intermédiaires de la voie de l'AMPc

### a). Récepteur.

Différentes approches génétiques comme la cartographie, le clonage positionnel ou l'analyse de mutants a permis la découverte de nouveaux récepteurs chez les végétaux supérieurs.

Récemment, plusieurs séquences génomiques possédant une grande similarité avec la séquence des récepteurs à 7 domaines transmembranaires des cellules animales ont été identifiées chez des plantes mutantes d'*A. thaliana* insensibles aux cytokinines. La protéine GCR1 (G protein-coupled receptor 1), par exemple, ressemble à un récepteur à protéine G. Des expériences sur des plantes transformées avec une construction anti-sens GCR1 ont un développement cotylédonnaire et foliaire ralenti, ainsi qu'une floraison précoce, phénotype évoquant effectivement un lien avec les cytokinines (Hooley R *et al.*, 1998 ; Plakidou-Dymock *et al.*, 1998).

Bien qu'il n'y ait pas de lien entre ce récepteur et la production d'AMPc, il est clair que les plantes possèdent des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Le projet de séquençage du génome d'*A. thaliana* permettra probablement de trouver de nouveaux récepteurs appartenant à cette famille.

### b). Les protéines G.

Les protéines G existent également chez les végétaux. Différentes méthodes ont été utilisées pour les mettre en évidence. Tout d'abord, la génétique a permis d'identifier des gènes codant pour des protéines homologues aux protéines G animales (Ma *et al.*, 1990). Par exemple, le gène GAP1 composé de 14 exons et de 13 introns codant pour une sous-unité  $\alpha$  d'une protéine G, a été isolée chez *A. thaliana*. La protéine GAP1 possède un poids moléculaire de 44 KDa. La taille de cette protéine est supérieure à celle des sous-unités  $\alpha$  des protéines  $G_i$  de cellules animales à cause de la présence de plusieurs insertions. GAP1 présente 36 % d'identité et 73 % d'homologie avec la sous-unité  $\alpha$  animale.

Deuxièmement, l'approche pharmacologique a permis, grâce à des activateurs (GTP $\gamma$ , la toxine du choléra,...) et des inhibiteurs (GDP $\beta$ S, la toxine pertussique,...)

de protéines G chez les cellules animales de démontrer la présence de protéines identiques au niveau du bourgeon apical de pois étiolé. Les protéines G y contrôlent la photomorphogénèse et se trouvent sous le contrôle des variations d'intensité de la lumière bleue (Ma *et al.*, 1990).

Finalement, l'approche immunologique a montré que des protéines végétales étaient spécifiquement reconnues par des anticorps dirigés contre des sous-unités de protéines G animales en Western blot.

### **c). L'adénylate cyclase.**

L'activité adénylate cyclase (AC) est connue depuis longtemps aussi bien chez les végétaux inférieurs que supérieurs. Une activité AC a été détectée chez *Chlorogonum* (phytoflagellée), mais également chez plusieurs champignons (Bolker, 1998), chez *Pinus pinea* (Martelli *et al.*, 1887).

Une activité AC dépendante des complexes  $Ca^{++}$ -calmoduline a également été identifiée dans un homogénat de cellules chez *Medicago sativa*. L'essentiel de l'activité AC (80 %) était associée à la fraction protéique membranaire. Une approche pharmacologique a permis de montrer que l'AC était sous le contrôle d'une protéine G : l'addition de  $GTP\gamma S$  à la fraction membranaire, un analogue non hydrolysable de GTP, stimule cette activité.

Une troisième activité AC a été identifiée dans des tiges chez *Pisum sativa* (Pacini *et al.*, 1993). Des essais enzymatiques ont été effectués sur cette enzyme : une application de 100 nM de GTP active l'AC, alors qu'une application de 100  $\mu M$  l'inhibe. Cette expérience prouve également la présence d'une protéine G activant l'AC.

Chez le lis, un système AC/PDE a été mis en évidence. En utilisant un inhibiteur de PDE, l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) et un activateur de l'AC, la forskoline, Tezuka *et al.* (1993) ont réussi à provoquer une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc et à induire la croissance de tubes polliniques.



Récemment, le premier gène codant pour une AC végétale a été cloné prouvant clairement l'existence d'une AC chez les végétaux (accession number T15055) (van de Loo *et al.*, 1995).

Un ADNc encodant CAP (adenylyl cyclase-associated protein), un homologue d'AC, a été isolé d'une banque de cDNA de fibre de coton (*Gossypium hirsutum*). Ce ADNc contient une ORF qui encode un résidu de 471 acides aminés. L'analyse par Northern blot a montré que le gène CAP du coton était exprimé surtout dans les fibres jeunes (Kawai *et al.*, 1998).

#### **d). La protéine kinase A.**

Plusieurs sous-unités catalytiques de PK animales de type Ser/thr ont été isolées chez différentes espèces végétales en utilisant des sondes de séquences conservées chez les PK ser/thr animales. Mais ces différentes séquences n'ont malheureusement pas été analysées de manière détaillée (Hayashida *et al.*, 1993).

Des études menées sur des protoplastes de *Vicia faba* ont montré que le PKI (PKA inhibitor ou "Walsh inhibitor" qui reconnaît la sous-unité catalytique et l'inhibe) diminue le courant  $K^+$  dépendant de l'AMPc. Ces résultats suggèrent l'implication d'une PKA dans la régulation des flux ioniques (Li *et al.*, 1994).

La PKA phosphoryle le phytochrome A, un photorécepteur régulant la photomorphogénèse chez la plante. Cette protéine-récepteur possède 2 sites de phosphorylation pour la PKA (Lapko *et al.*, 1996).

La PKA module également l'activativité de l'aquaporine  $\alpha$ -TIP, un canal hydrique de la vacuole. La protéine  $\alpha$ -TIP possède 3 sites phosphorylables par la PKA. L'application d'agonistes de la voie de l'AMPc, comme l'IBMX ou la forskoline, sur des oocytes de Xénope augmente l'activité de cette aquaporine. Bien plus, une sous-unité catalytique activée de PKA bovine est capable de phosphoryler  $\alpha$ -TIP et de moduler son activation *in vitro* (Maurel *et al.*, 1995).

### e). CREB.

Plusieurs protéines CREB-like végétales ont été clonées et séquencées chez le tabac, l'arabette, le blé, le haricot et la chicorée. Ces protéines ressemblent fortement au facteur CREB des cellules animales et se fixent sur l'ADN au niveau de la séquence CCACGTCA, homologue à de la séquence CRE animale (Ishiguro *et al.*, 1993). Ces protéines contiennent également un domaine b-ZIP permettant la formation d'homodimères et d'hétérodimères. Ces protéines sont mieux connues sous le terme de CPRFs (common plant regulatory factor) (Armstrong *et al.*, 1992).

Malheureusement, la fonction des CREB-like végétales n'est pas encore élucidée. Il n'est, par exemple, pas démontré qu'il existait un lien direct entre la production d'AMPc et l'activation des protéines CREB-like.

## Rôles physiologiques de l'AMPc chez les végétaux.

Si tous les composants de la voie ont été identifiés chez les végétaux supérieurs, il reste néanmoins à démontrer le rôle physiologique d'une telle voie. Malgré la difficulté apparente de cette entreprise, plusieurs phénomènes physiologiques semblent être dépendants de l'AMPc.

L'AMPc joue un rôle dans l'élongation des tubes polliniques au cours de l'auto-fécondation incompatible chez *Tradescantia paludosa* et chez *Arachis hypogea*. Ce rôle signalétique a été démontré grâce à l'utilisation d'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) inhibant les phosphodiésterases et un activateur d'AC, la forskoline (Tezuka *et al.*, 1993).

Dans les cellules du mésophyle chez *Vicia faba*, l'AMPc active l'ouverture de canaux  $K^+$ . L'utilisateur d'inhibiteurs de PKA montre que l'ouverture des canaux  $K^+$  est sous le contrôle d'une PKA-like. A l'opposé, des expériences récentes de patch clamp chez la carotte ont montré que l'AMPc induit des flux ioniques au travers de la membrane plasmique sans étape de phosphorylation. Dans ce cas précis, les canaux ioniques seraient activés directement par l'AMPc (Li *et al.*, 1994).

L'AMPc induit également la synthèse de phytoalexines chez la carotte et le haricot en présence d'un agent pathogène, régule la mobilité flagellaire chez l'algue *Spirulina platensis* (Ohmori *et al.*, 1993), contrôle l'expression du sexe chez *Bryum argenteum* (Tezuka *et al.*, 1993) et active la PAL (phenylalanine ammonia lyase) sans intervention d'étape de phosphorylation ou de transcription.

Récemment, de nouvelles hypothèses ont été émises quant à l'implication de l'AMPc sur les régulateurs de croissance. Ichikawa *et al.* (1997) ont découvert une AC agissant sur la voie de l'auxine. Ces expériences ont démontré que des protoplastes de tabac traités avec l'AMPc ou la forskoline ne nécessitent pas d'auxine pour se diviser, impliquant un rôle éventuel de l'AMPc dans cette voie.

Comme nous venons de le constater au travers de quelques exemples, l'hypothétique voie de transduction du signal de l'AMPc chez les plantes comprend encore de nombreux "points obscurs".

Dans ce mémoire, nous allons exploiter les résultats obtenus au laboratoire (Bellefontaine, 95 et Draye, 98) afin d'apporter une nouvelle contribution à la compréhension de la voie de l'AMPc au sein d'une plante confrontée à différents stress physiologiques.



*II. Objectifs.*

## LES OBJECTIFS.

Comme nous venons de le voir dans l'introduction, la voie de l'AMPC existe probablement chez tous les végétaux, mais on ne possède aucune certitude quant au fonctionnement de cette voie au sein des cellules.

Depuis plusieurs années, le laboratoire étudie un intermédiaire de cette voie : le facteur de transcription CREB. Différents outils moléculaires ont ainsi été produits dans le but d'étudier le rôle physiologique de CREB dans la cellule (Bellefontaine, 1995 ; Draye, 1998).

Dans le cadre de cette étude, les objectifs que nous nous sommes fixés dans ce mémoire sont d'étudier, dans une culture en suspension de tabac BY-2, le mode d'activation de CREB au niveau transcriptionnel et/ou post-traductionnel en présence de modulateurs de la voie de l'AMPC et lors d'un stress pathologique.



*١١١. Matériel et méthodes.*



# 1. MATERIEL.

## 1.1 Culture d'E.coli.

- Milieu liquide : milieu LB (Broth Base; bactotryptone 1 %, extrait de levure 0.5 %, NaCl : 0.17 M, bacto-agar : 1.5%)
- Milieu solide (LBA) : milieu LB,+ agar 1.5%

La sélection des bactéries recombinantes est réalisée sur milieu LB contenant de l'ampicilline (200µg/ml). Les antibiotiques sont rajoutés dans le milieu ou sur la boîte de Pétri en fonction des besoins.

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

## 1.2. Culture en suspension de *Nicotiana tabacum*.

La souche BY-2 de *Nicotiana tabacum* constitue un matériel végétal simplifié (Nogata *et al.*, 1992). Les cellules présentent un taux de croissance élevé (80 à 100 fois en une semaine) dans une grande homogénéité. De plus, l'application de simulations de stress se réalise plus facilement sur une culture de cellules que sur une plante.

Les cellules récoltées au cours des différentes simulations de stress seront filtrées grâce à une pompe à vide et ensuite plongées dans l'azote afin de fixer le temps.

### Composition du milieu de culture

- Sels de Murashige et Skoog : 4,4945 g/L
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,2 g/L
- Sucrose : 30 g/L
- Thiamine-HCl : 0,1 mg/L
- 2,4-D : 0,2 mg/L
- Myo-inositol : 100 mg/ml
- PH : 5,8

### Conditions de culture

Une suspension cellulaire de 80 ml est cultivée dans des erlenmeyers de 250 ml, et ceci dans une chambre noire thermostatée (25°C) et sous agitation (105 rpm). Après 7 jours de culture, les cellules sont repiquées : 4 ml de suspension pour 80 ml de milieu frais.

### 1.3. Les amorces.

Durant ce mémoire, 5 amorces différentes ont été utilisées afin d'amplifier une partie des ADNc de CREB-A, CREB-B et de l'ubiquitine. La séquence de ces amorces est donnée ci-dessous.

Les amorces pour CREB-A :

5'-CGG-GAT-CCT-CAG-GCG-TCT-TCT-GCT-TGT-TG-3' (CR4)

5'-CCG-CTC-GAG-AAC-CGT-GAG-GCT-GCA-CGA-AAA-3' (CR6)

Les amorces pour CREB-B :

5'-CGG-GAT-CCT-CAG-GCG-TCT-TCT-GCT-TGT-TG-3' (CR4)

5'-CCG-CTC-GAG-AAT-GTC-CAA-CAA-CTT-GAA-AGT-AGC-3' (CR7)

Les amorces pour l'ubiquitine :

5'-AGC-TGG-AAA-CGG-CTG-CTA-AT-3' (UBI1)

5'-ACG-GGT-TGA-CTC-TTT-CTG-GA-3' (UBI2)

## 2. METHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES.

### 2.1. Extraction d'ADN génomique de plantes.

#### Principe

L'extraction se base sur la méthode de Murray et Thompson. Le CTAB lyse des membranes végétales et libère l'ADN dans le milieu. L'étape comprenant l'ajout de chloroforme et d'alcool isoamylique permet de dénaturer les protéines. Enfin, l'ajout du tampon Murray et Thompson élimine les sels et le CTAB résiduel et maintient les acides nucléiques précipités. L'ADN génomique ainsi extrait est utilisé pour vérifier le fonctionnement des amorces.

#### Solutions

- Tampon 2X CTAB (pH 8.0) : 2 % CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 % PVP-40. (N.B. : le  $\beta$ -mercaptoéthanol est ajouté à la dernière minute).
- Tampon de lavage « Murray et Thompson » : 76 % (v/v) éthanol, 10 mM EDTA.

#### Protocole

- Préchauffer la solution de CTAB 2X à 60° C. Mettre l'isopropanol au frigo (4° C).
- Refroidir le mortier et le pillon avec de l'azote liquide.
- Peser l'échantillon ( $\pm 3$  g).
- Broyer l'échantillon dans un mortier, en présence d'azote liquide, jusqu'à obtenir une poudre.
- Ajouter 7.5 ml de CTAB 2X/g de cellules broyées.
- Bien homogénéiser.
- Incuber à 60° C pendant 30 minutes avec agitation périodique (toute les 5 minutes).
- Extraire avec un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) en agitant manuellement par inversion des tubes pendant 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 3500 rpm 10 minutes à température ambiante.
- Récupérer la phase aqueuse avec une pipette à embout large.
- Refaire une extraction chloroforme : alcool isoamylique (24:1) et centrifuger 20 minutes à 3500 rpm.
- Précipiter dans 2/3 de volume d'isopropanol froid (4° C). Homogénéiser par inversion et laisser précipiter 1 heure à température ambiante.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 10 ml de tampon «Murray et Thompson ». Resuspendre le culot.
- Agiter pendant 1 heure à l'agitateur rotatif.
- Centrifuger à 2500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Inverser le tube sur du papier absorbant et sécher pendant 10 minutes à l'air libre.



- Sécher 3 à 5 minutes sous vide.
- Resuspendre dans 0.3 à 1 ml de TE 1X. Si problème, laisser à 4° C pendant 1 heure, quelques heures ou la nuit.
- Ajouter 1 µl de RNase DNase free (10 ng), incuber 30 minutes à 37° C.
- Ajouter 2.5 volumes d'éthanol froid. Homogénéiser par inversion. Mettre à -20° C pendant 30 minutes.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4° C.
- Eliminer le surnageant, laver à l'éthanol 70 %. Sécher le culot et le resuspendre dans 100 à 300 µl de TE 1X et stocker à -20° C.

## 2.2 Réaction de PCR.

### Principe

La réaction de PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN au moyen d'amorces spécifiques.

### Solutions

- x µl d'ADN (x varie en fonction de la concentration en ADN)
- 1 µl d'amorce gauche (100 pmoles)
- 1 µl d'amorce droite (100 pmoles)
- 5 µl de tampon PCR
- 1 µl de dNTP (stock à 10 mM)
- 1 unité enzymatique de Taq polymérase (Boehringer Mannheim)
- y µl d'H<sub>2</sub>O pour atteindre 50 µl

### Cycles d'amplification :

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

## 2.3. Extraction d'ADN plasmidique d'*E. coli*.

Une extraction d'ADN plasmidique a été nécessaire pour l'obtention d'une sonde nucléotidique CREB-A utilisée en Northern blot.

### Solutions

- Tampon Tris 25 mM (pH 8.0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysozyme 4 mg/ml
- NaOH 0.2 M + SDS 1 %
- Acétate de potassium 3 M + acide acétique 1.8 M

- Phénol/ chloroforme (24 :1)
- Ethanol 96 % (maintenu à  $-20^{\circ}\text{C}$ )
- Ethanol 76 % (maintenu à  $-20^{\circ}\text{C}$ )
- Tris 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM
- Rnase (solution stock à 10 mg/ml)

### **Protocole**

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

## **2.4. Isolement d'ARN**

### **Principe**

Le Trizol contient de l'isothiocyanate de guanidine permettant de maintenir intact l'ARN lors de la destruction des cellules. L'ajout de chloroforme permet de séparer l'ARN, se trouvant dans la phase aqueuse, des autres composants se situant dans la phase organique inférieure. Enfin, l'ARN total est précipité par l'ajout d'alcool isopropylique.

## Solutions

- TRIzol™ Reagent (Total RNA Isolation Reagent) (GIBCO BRL).
- Alcool isopropylique
- Ethanol 75 % Rnase free (RF)
- Chloroforme
- Eau DEPC 0.1 %

## Protocole

- Peser 200 mg de cellules BY-2 filtrées.
- Broyer les cellules dans un creuset avec de l'azote liquide.
- Ajouter 1 ml de trizol. Laisser dégeler.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (le culot contient les membranes extracellulaires, les polysaccharides et l'ADN de haut poids moléculaire).
- Reprendre le surnageant et le mettre dans un autre tube.
- Ajouter 0.2 ml de chloroforme. Secouer vigoureusement pendant 15 secondes et incubé 2 à 3 minutes à t° ambiante.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Récupérer la phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN.
- Précipiter l'ARN en présence de 0.5 ml d'alcool isopropylique. Laisser incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Centrifuger à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Enlever le surnageant. Laver l'ARN précipité avec de l'éthanol 75% : au moins 1 ml d'éthanol. Centrifuger à 7500 rpm pendant 5 minutes à 4°C .
- Enlever le surnageant et sécher l'ARN précipité.
- Dissoudre l'ARN dans de l'eau DEPC 0.1%.
- Plonger l'ependorff dans un bain-marie à 55-60 °C pendant 10 minutes.

## **2.5. Dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre.**

### Principe

Les acides nucléiques absorbent la lumière UV à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ADN et l'ARN. Il est possible de calculer la concentration en acides nucléiques d'une solution grâce à sa DO.

$$\begin{aligned} 1 \text{ DO} &= 50 \mu\text{g}/\mu\text{l d'ADN} \\ &40 \mu\text{g}/\mu\text{l d'ARN} \end{aligned}$$

### Dosage

- Régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 260 nm.
- Régler le zéro de l'appareil en utilisant comme « blanc » le tampon dans lequel se trouvent les acides nucléiques.
- Diluer 1 µl d'acide nucléique à doser dans 1 ml du tampon dans lequel se trouve l'acide nucléique. Mélanger en retournant la cuvette.



- Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 260 nm au moyen de la cuvette à quartz.
- Recommencer mesurer ensuite à 280 nm pour doser les protéines.

Le rapport des absorbances à 260 et 280 nm permet de vérifier la pureté de l'ARN. Théoriquement, l'ARN pur a un rapport de 2.0.

## 2.6. Northern blot.

### Principe

Les ARN sont déposés dans un gel d'agarose en condition dénaturante. Après transfert par capillarité sur une membrane de nylon, cette dernière subit des étapes de saturation, d'hybridation avec une sonde marquée à la biotine et de révélation avec le système streptavidine / phosphatase alcaline (Biolabs).

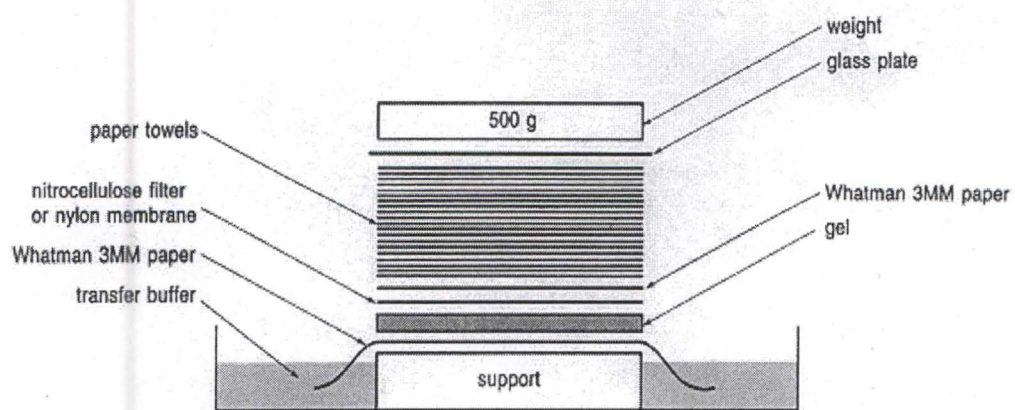
### Gel d'ARN

#### Solutions

- MOPS 10X : 0.2 M MOPS-NaOH pH 7.0, 50 mM AcNa, 5 mM Na<sub>2</sub> EDTA. Pour la conserver, cette solution doit être mise à l'abri de la lumière.
- Tampon de chargement : 50 % glycérol, 0.2 % de bromophénol, MOPS 1X qsp 1 ml.
- Tampon de dénaturation : 72 % formamide, 16 % formaldéhyde, 10 % de MOPS 10X, 0.5% glycérol et 5 mM d'EDTA.
- Eau DEPC 0.1 %
- Gel d'agarose 1.2 %. Pour 100 ml : 1.2 g d'agarose, 10 ml de MOPS 10X, 85 ml d'eau DEPC. Ajouter après chauffage 5 ml de formaldéhyde à 37 % et 2 µl de bromure d'éthidium (10mg/ml).

#### Protocole

- Laver la cuve d'électrophorèse et le peigne à l'eau DEPC 0.1 %, puis sécher à l'éthanol.
- Chauffer le gel d'agarose à 60°C, ajouter 5 ml de formaldéhyde à 37 % et 2 µl de bromure d'éthidium. Couler le gel.
- Pendant que le gel refroidit, préparer les échantillons. Ajouter à chaque échantillon : 2 µl d'ARN (±18 µg), 2.5 µl d'eau DEPC, 5 µl de tampon de dénaturation et 2.5 µl de tampon de chargement.
- Chauffer les différents éppendorfs 10 minutes à 65° C.
- Réaliser un pré-run du gel à 65-70 V dans du MOPS 1X pendant 10 minutes.
- Charger les échantillons et laisser migrer pendant 3 à 4 heures dans du MOPS 1X à 70 V (35 mA) ou la nuit à 1.5 V/cm.



**Figure 16 : Transfert sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon (Sambrook *et al.*, 1989).**

## **Transfert d'un gel d'ARN sur une membrane de nylon.**

### **Solution**

- Eau DEPC 0.1 %
- Tampon de transfert : 3 M NaCl, 8 mM NaOH, 2 mM sarkosyl.
- Tampon de neutralisation (5X) : 0.53 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.46 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> X H<sub>2</sub>O

### **Protocole**

- Laver le gel 3 à 4 fois avec de l'eau DEPC.
- Réaliser un montage identique à la *figure 16*.
- Laisser transférer pendant la nuit.
- Vérifier le bon fonctionnement du transfert en plaçant la membrane de nylon sous UV.
- Laisser la membrane 4 minutes sous UV et ensuite 2 heures à 80° C dans du papier aluminium.
- Stocker la membrane à 4° C dans le frigo.

## **Préparation des sondes marquées à la biotine de CREB-A et de CREB-B par PCR.**

### **Principe**

Afin de révéler la présence de transcrits des gènes CREB-A et B, il est nécessaire de procéder au marquage de sondes pour ces 2 gènes. Le marquage est ici effectué grâce à la biotine qui sera incorporée par réaction PCR. Les sondes s'hybrideront de manière spécifique avec les ARN correspondant lors du Northern blot.

### **Protocole**

Préparation des échantillons:

- 5 µl de tampon PCR 10X
- 0.5 µl de Taq Polymérase
- 1 µl d'amorce gauche (100 pmoles)
- 1 µl d'amorce droite (100 pmoles)
- 1 µl d'ADN issu d'une mini-prep, (CREB-A ou CREB-B)
- 1 µl de dATP (concentration stock à 10 mM)
- 1 µl de dGTP (concentration stock à 10 mM)
- 1 µl de dTTP (concentration stock à 10 mM)
- 2 µl de dCTP (concentration stock à 3.4 mM)
- 9 µl de dCTP marqués à la biotine (concentration stock à 0.37 mM)
- eau qsp 50 µl

Les cycles utilisés lors de la réaction de PCR sont décrits au point 2.2. L'efficacité de la PCR est vérifiée sur gel d'agarose 1 %.



## **Préhybridation et hybridation.**

### **Principe**

La préhybridation sature les sites de la membrane ne contenant pas les ARN afin de diminuer au maximum le bruit de fond résultant d'une fixation non spécifique. La sonde s'hybridera sur la membrane de manière spécifique en liant les ARN codant pour CREB-A ou CREB-B selon la sonde utilisée.

### **Solutions**

- ADN de sperme de saumon (concentration stock = 2 mg/ml)
- Solution de préhybridation : SSC 6X, Denhart's Reagent 5X, et du SDS 0.5 %.
- SSC 20X, pour 1 L : 175.5 g de Na Cl, 88.2 g de Na-citrate, mettre à pH 7.0.
- Denhart's 10X : 1 % de BSA, 1 % de Ficoll, 1% de PVP.

### **Protocole**

- Immerger la membrane dans du SSC 6X pendant 2 minutes.
- Placer la membrane dans un hybritube (côté ARN à l'intérieur du tube) et le mettre dans le four à 65° C.
- Ajouter 25 ml de la solution de préhybridation dans l'hybritube.
- Dénaturer l'ADN hétérologue de sperme de saumon (100 µg/ml) : le mettre pendant 5 minutes à 95° C, puis directement dans la glace.
- Incuber pendant 1 heure à 68° C.
- Dénaturer la sonde (= le produit PCR, soit CREB-A, soit CREB-B).
- Ajouter la sonde à la solution de préhybridation de l'hybritube.
- Incuber à 68° C pendant une nuit.

N.B. : La BSA et l'ADN de sperme de saumon saturent la membrane.

## **Lavages.**

### **Principe**

La membrane d'hybridation subira différents lavages successifs durant lesquels la concentration en sels sera progressivement diminuée afin d'augmenter la spécificité de l'hybridation et de diminuer le bruit de fond.

### **Protocole**

- Immerger la membrane dans une solution SSC 2X, SDS 0.1 % pendant 5 minutes à température ambiante.
- Répéter cette étape de lavage.
- Immerger la membrane dans une solution SSC 0.1X, SDS 0.1 % pendant 15 minutes à température ambiante ou à 68°C.

N.B. : On peut récupérer la solution de préhybridation contenant la sonde et la stocker à -20°C pour une utilisation ultérieure.

## Détection et révélation à la biotine.

### Principe

La détection avec le Phototope™ Detection Kit (Biolabs) comprend une étape de saturation, une incubation avec de la streptavidine, une incubation avec de la phosphatase alcaline (PA) biotinylée et une réaction finale de chémoluminescence. Le CDP-Star™ est transformé en un produit responsable de l'émission locale de lumière récoltée sur un film RX.

### Protocole

- Immerger la membrane dans la solution bloquante (0.1 ml \* X cm<sup>2</sup>) pendant 5 minutes à température ambiante.
- Imprégner la membrane de streptavidine pendant 3 minutes (0.05 ml \* X cm<sup>2</sup>).
- Laver la membrane dans la solution bloquante diluée 10X pendant 10 minutes (0.5 ml \* X cm<sup>2</sup>). Répéter l'étape de lavage.
- Imprégner la membrane de PA biotinylée diluée 760X (0.05 µl \* X cm<sup>2</sup>) dans la solution bloquante (0.05 ml \* X cm<sup>2</sup>) pendant 3 minutes à température ambiante.
- Laver dans la solution de lavage II dilué 10X pendant 5 minutes (0.5 ml \* X cm<sup>2</sup>).
- Répéter ce lavage.
- Imprégner pendant 5 minutes à température ambiante, la membrane de CDP-Star dilué 100X dans la solution de lumigen diluent (pH 9.6).
- Sceller la membrane dans un sac en plastique.
- Déposer la membrane dans une cassette à l'obscurité et ajouter le film Kodak XAR-5 (Sigma).
- Révéler le film avec des solutions de révélation, fixation et de lavage.

## **2.7. RT-PCR.**

### **A. Synthèse du premier brin d'ADNc.**

#### **Principe**

Le kit « First strand cDNA synthesis » est utilisé pour la synthèse du premier brin. Ce kit comprend la reverse transcriptase. Cette enzyme a la capacité de former un brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ARN.

#### **Solutions**

- "Bulk first-strand cDNA reaction" contenant la reverse transcriptase, BSA, dATP, dCTP, dGTP, et dTTP.
- solution de DDT (200mM)
- Not I-d(T)<sub>18</sub>

#### **Protocole**

- Placer de 1 à 5 µg d'ARN total dans un eppendorf et ajuster le volume de l'ARN à 8 µl avec de l'eau DEPC.
- Chauffer la solution d'ARN pendant 10 minutes à 65° C, puis la mettre dans la glace.
- Dans un nouvel eppendorf, ajouter 5 µl de bulk first-strand synthesis homogénéisé, 1 µl de primer Not I-d(T)<sub>18</sub>, 1 µl de DDT et les 8 µl d'ARN dénaturé. Pipeter pour homogénéiser et incubé 1 heure à 37° C.

### **B. Amplification sur du premier brin d'ADNc.**

#### **Principe**

La réaction de PCR va permettre l'amplification de l'ADNc des gènes CREB-A et B grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques.

#### **Solution**

- 5 µl de l'hétéroduplex ARN/ADN produit précédemment
- 5 µl de tampon PCR 10X
- 1 µl de dNTP 20 mM
- 1 µl d'amorce gauche (100 pmoles)
- 1 µl d'amorce droite (100 pmoles)
- 1 µl de Taq Polymérase (5 U/ 1 µl)
- Ajouter de l'eau pour arriver à un volume final de 50 µl.



## Protocole

Ajouter les différents composants dans un tube PCR. Programmer l'appareil PCR selon les cycles d'amplifications souhaités :

Etape	Temps (min.)	Température (°C)	Répétition
Dénaturation	1minute	94°C	1X
Dénaturation	1minute	94°C	39X
Hybridation	1 minute	X°C	
Elongation	3 minutes	68°C	
Terminaison	10 minutes	68°C	1X

X°C pour la température d'hybridation varie selon le type d'amorces : 55°C pour les amorces CREB et de l'ubiquitine.

## **2.9. Gel d'électrophorèse (gel horizontal).**

### Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage en agarose du gel est ajusté en fonction de la taille des fragments à séparer. L'ADN est détecté dans le gel en présence de bromure d'éthidium qui s'intercale entre les 2 brins de l'ADN et visible via l'utilisation d'un transilluminateur UV. La taille des fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer un étalon de fragments d'ADN de taille connue. Les étalons utilisés durant ce mémoire est le Smart ladder (Eurogentec). Le pourcentage en agarose du gel est ajusté en fonction de la taille des fragments à séparer.

### Solutions

- Tampon TAE (Tris-acétate 4mM, EDTA 1 mM pH 8.0)
- Agarose 0.8 % ( en fonction de la taille des fragments à séparer)
- Bromure d'éthidium (solution stock à 10 mg/ml)
- Bleu de bromophénol (glucose 40 %, bleu de bromophénol 0.025 %)

### Protocole

- Préparer un gel d'agarose 0.8 % dans le tampon TAE. Ajouter 3 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml) par 50 ml de gel.
- Couler le gel dans un support adéquat doté de peignes. Laisser refroidir le gel 30 minutes.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Ajouter 1 volume de bleu de bromophénol à 5 volumes d'échantillons à analyser.
- Déposer 10 µl de l'échantillon par puits.
- Faire migrer les échantillons pendant 1 h à 80 mA dans le tampon d'électrophorèse TAE.
- Visualiser les bandes au transilluminateur réglé à 302 nm.

## 3. METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.

### 3.1. Extraction des protéines végétales

#### Solution

- Polyvinyl-polypyrrolidone insoluble
- Tampon d'extraction : Tris 50 mM pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1.0 %, glycérol 15 % (Ajouter le  $\beta$ -mercaptoéthanol avant utilisation).

#### Protocole

- Peser environ 300 mg de plantes ou de cellule en culture et les mettre dans des tubes à centrifuger en verre et à fond conique de 15 ml contenant 50 mg de polyvinyl-polypyrrolidone (pvp) insoluble .
- Placer les tubes dans la glace + eau.
- Ajouter dans chaque tube 1,5ml de tampon d'extraction (tris 50 mM pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1.0%, glycérol 15%). Sous hotte aspirante, ajouter avant l'utilisation 100 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol à 9.9ml de tampon tris/glycérol déjà prêt.
- Tout en gardant les tubes dans la glace, homogénéiser 2 minutes à l'ultra-turrax.
- Centrifuger les tubes 30 minutes à 4000 rpm et à 4°C (centrifugeuse BHG *Hermle* ZK364 préalablement thermostatée).
- Vider les surnageant dans des eppendorfs de 1.5 ml et centrifuger 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C.
- Récupérer les surnageants dans des nouveaux eppendorfs.

### 3.2. Electrophorèse SDS-PAGE (méthode de Laemmli)

#### Principe

L'électrophorèse SDS-Page consiste à faire migrer des protéines dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le gel résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide et de bis-acrylamide en présence de deux catalyseurs que sont l'ammonium persulfate et le TEMED qui vont induire la polymérisation des monomères en libérant des radicaux libres.

Le gel de polyacrylamide et le tampon, contiennent du SDS en excès et qui, en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (un réducteur de pont disulfure), dénature les protéines et les charge négativement de manière uniforme. Les protéines étant toutes chargées négativement, leur migration dans le gel de polyacrylamide sera inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

## Gel d'électrophorèse

### Solution

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

### Composition du gel SDS-Page

- Gel d'empilement 5 %

Pour un gel de 4 ml :

H <sub>2</sub> O	2.7 ml
30 % acrylamide mix	0.67 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.5 ml
10 % SDS	0.04 ml
10 % ammonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml

- Gel de migration 15 %

	Pour un gel de 10 ml	Pour un gel de 40 ml (grand gel)
H <sub>2</sub> O	2.3 ml	9.2 ml
30% acrylamide mix	5.0 ml	20.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	10.0 ml
10% SDS	0.1 ml	0.4 ml
10 % ammonium persulfate	0.1 ml	0.4 ml
TEMED	0.004 ml	0.016 ml

- Marqueurs de taille

<b>BIO-RAD :</b>		<b>Pharmacia Biotech :</b>	
Myosine	203 kDa	Phosphorylase b	94 kDa
β-galactosidase	116 kDa	Albumine bovine	64 kDa
Albumine bovine	83 kDa	Ovalbumine	43 kDa
Ovalbumine	48.7 kDa	Anhydrase carbonique	30 kDa
Anhydrase carbonique	33.4 kDa	Inhibiteur de trypsine	20.1 kDa
Inhibiteur de trypsine	28.2 kDa	α-lactalbumine	14.4 kDa
Lysozyme	20.7 kDa		
Aprotinine	7.6 kDa		



### Protocole

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

## **3.3. Visualisation des protéines par coloration au bleu de Coomassie**

### Solutions

- Solution de coloration du gel : bleu de Coomassie (Brillant Blue R250) 0.1 %, méthanol 40 %, acide acétique 10 %, H<sub>2</sub>O 50 %
- Solution de décoloration du gel : méthanol 40 %, acide acétique 10 %, H<sub>2</sub>O 50 %

### Protocole

- Plonger le gel dans la solution de coloration pendant 30 minutes.
- Retirer le gel de la solution de coloration, le plonger dans la solution de décoloration et le laisser décolorer en renouvelant plusieurs fois la solution.

## **3.4. Transfert de protéines d'un gel SDS-Page sur une membrane de nitrocellulose.**

### Principe

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose permet de tester par western blot par exemple si des anticorps reconnaissent ou non des protéines. La membrane permet de fixer sur un support des protéines afin de tester une complémentation.

### Solution

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

### Protocole

- Séparer le gel d'empilement du gel de migration. Equilibrer le gel de migration dans le tampon de transfert pendant 10 minutes.
- Couper les papiers buvards et la membrane de nitrocellulose (Hybond™-C extra, Amersham) à la dimension du gel de migration.
- Humidifier la membrane avec de l'eau distillée puis tremper celle-ci dans le tampon de transfert pendant 5 minutes.
- Assembler la cassette de transfert dans le tampon de transfert en évitant les bulles d'air.
- Remplir la cuve (Hoefer TE 50 fois) avec du tampon de transfert jusqu'au niveau des électrodes.
- Placer un barreau magnétique dans le fond de la cuve et connecter celle-ci avec un bain thermostaté à une température de 15°C.
- Connecter la source de courant à la cuve de transfert. Les conditions de transfert sont 1.0 A et 100 V pendant 1 heure.
- Après 1 h, déconnecter la source de courant et retirer la cassette de la cuve.
- Placer le gel dans une solution de bleu de Coomassie pour vérifier le bon fonctionnement du transfert.

## **3.5. Dot-blot et western blot.**

L'analyse en dot-blot est un moyen rapide pour déterminer les quantités de protéines optimales à déposer en western blot.

Le western blot permet de connaître le poids moléculaire des protéines analysées grâce à l'utilisation d'un étalon.

Le principe de la révélation du dot-blot et du western est basé sur la reconnaissance d'un antigène (ex : CREB A) immobilisé sur un support solide (ex : membrane de nitrocellulose) par des anticorps spécifiques (ex : anticorps anti-CREB A), eux-mêmes détectés par des anticorps secondaires (ex : anticorps anti-immunoglobuline couplés à une enzyme). La révélation du test s'effectue par la conversion catalysée par l'enzyme d'une substance soluble en un précipité insoluble.

### Le Dot-blot

#### Solutions

- TBS (Tris-buffered saline) : 0.14 M NaCl, 27 mM KCl, et 25 mM Tris pH 7.4.
- Nitrocellulose : Hybond C-extra.
- Appareil Bio-Dot, BioRad.

## Protocole

- Découper une feuille de nitrocellulose sous format 9\*12cm, Pré-incuber cette membrane dans de l'eau pendant 15 minutes à température ambiante, puis dans le tampon TBS pendant 15 minutes à température ambiante.
- Bien égoutter la membrane entre 2 feuilles de papier absorbant avant de la déposer dans l'appareil.
- Déposer la membrane sur l'appareil et l'hydrater 2 fois avec 100µl/puit de TBS.
- Déposer la solution de protéines avec la concentration voulue. Laisser la solution descendre par gravité et appliquer le vide pour une adsorption optimale de l'antigène sur la membrane.
- Saturer la membrane de nitrocellulose pendant une nuit à 4° C, avec la solution de saturation Tween-20 0.1 %.
- Rincer la membrane dans le tampon TBS.
- Incuber la membrane, à température ambiante, pendant 1 heure avec le polysérum adéquat (épuisé ou non, naïf ou rappel) et dilué 100 fois.
- Laver la membrane 3 fois, à température ambiante, avec le tampon TBS.
- Incuber la membrane pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Amersham) et dilué 500 fois.
- Laver la membrane 3 fois, à température ambiante, avec le tampon TBS.
- Révéler la membrane avec la solution de révélation.

## Le western blot

### Solutions

- Solution de saturation : Tween-20 0.1% dans TBS
- TBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl et 3 g Tris)
- Solution de révélation : 10 ml méthanol, 60 mg HRP, 50 ml TBS et 30 µ d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Protocole

- Transférer les protéines d'un gel SDS-Page sur une membrane de nitrocellulose.
- Saturer la membrane de nitrocellulose pendant une nuit à 4° C, avec la solution de saturation Tween-20 0.1 %
- Rincer la membrane dans le tampon TBS
- Incuber la membrane, à température ambiante, pendant 1 heure avec le polysérum adéquat (épuisé ou non, naïf ou rappel) et dilué 100 fois.
- Laver la membrane 3 fois, à température ambiante, avec le tampon TBS.
- Incuber la membrane pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Amersham) et dilué 500 fois.
- Laver la membrane 3 fois, à température ambiante, avec le tampon TBS.
- Révéler la membrane avec la solution de révélation.



### 3.6. Protocole d'extraction d'oligo de DP $\geq$ 9

#### Principe

Les oligopectates de degré de polymérisation supérieur ou égal à 9 sont les seuls capables de former une structure en "egg-box" en emprisonnant des ions Ca<sup>++</sup>. La séparation de ces structures avec les autres oligopectates se base sur le même principe par précipitation des oligos de DP $\geq$ 9 avec le baryum.

#### Solutions

Pectates de Na<sup>+</sup>, NaCl, BaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Alcool dénaturé

HCl 37 %

#### Protocole

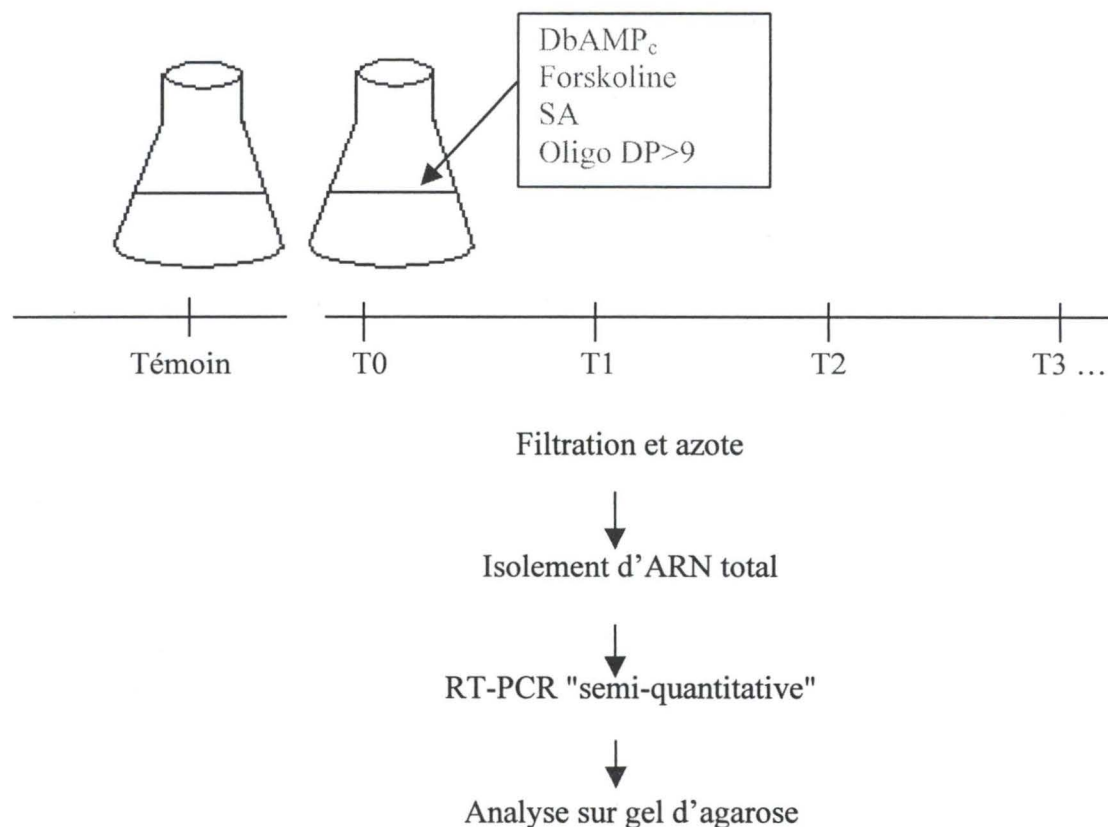
- Réaliser une hydrolyse à reflux de 500 ml d'une solution de pectates de Na<sup>+</sup>, 10g/L pendant 4 heures à 100°C. Après refroidissement, porter à pH 5.2 la solution.
- Précipiter les oligopectates de DP $\geq$ 9 en ajoutant du NaCl jusqu'à une concentration finale de 0.8 M puis centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et suspendre le culot dans 400 ml d'eau désionisée.
- Précipitation des oligopectates de DP $\geq$ 9 avec 0.1g de BaCl<sub>2</sub>/g de pectate de sodium.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et suspendre le culot dans 200 ml d'eau désionisé.
- Précipiter le baryum en ajoutant 1.2g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes, concentrer le surnageant au rotavapor.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes et récupérer le surnageant.
- Porter la solution à 60 ml avec H<sub>2</sub>O, ajouter 240 ml d'alcool dénaturé et 12 ml HCl 37% (éthanol 80%, HCl 0.5M) puis centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.
- Répéter les 2 opérations précédentes et resuspendre le culot dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O.
- Ajuster le NaCl à une concentration finale de 0.8 M pour précipiter les oligopectates de DP $\geq$ 9, ajuster le pH à 7 puis centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.
- Suspendre le culot dans 40 ml d'H<sub>2</sub>O et 160 ml d'éthanol.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et évaporer l'éthanol du culot en séchant 2 jours à l'air libre .
- Broyer le culot sec et stocker à -20°C.

Les oligopectates de DP $\geq$ 9 sont ensuite testés par HPLC (sur le principe d'échange ionique) afin de vérifier leur DP. La colonne d'HPLC, Carbo Pac PA 100, contient une résine de polystyrène-divinylbenzène contenant des groupements sulfites (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sur lesquels sont greffés des groupements amines (NR<sub>3</sub><sup>+</sup>). Les oligogalacturonides possèdent une fonction acide chargée négativement à pH neutre. Plus le DP des oligogalacturonides est élevé et plus ceux-ci possèdent des charges négatives : ces derniers seront mieux retenus sur la colonne. L'élution se réalise par un gradient croissant de NaOAc. Les oligogalacturonides de faibles DP sortent les premiers. Leurs groupements hydroxyls sont ionisés par du NaOH afin de les détecter. Cette détection est constituée d'une séquence de 3 potentiels (E1, E2, E3) au niveau d'une électrode en or placée à la sortie de la colonne HPLC.

#### 4. PROTOCOLE GENERAL DE LA MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION CREB (FIGURE 17).

Des cultures cellulaires BY-2 de tabac de 3 jours ont été utilisées lors de cette expérience. Ces cellules subissent différentes simulations de stress : par la forskoline (100  $\mu$ M), le dibutyryl-AMPc (100  $\mu$ M), l'acide salicylique (250  $\mu$ M) ou les oligopectates de DP $\geq$ 9 (0.2 mg/ml). Ensuite, une aliquote de 10 ml de suspension cellulaire est prélevée, filtrée, et congelée dans l'azote liquide à différents temps de traitement.

L'ARN total, matériel de base nécessaire à la réalisation d'une RT-PCR "semi-quantitative", est ensuite extrait. L'ADNc ainsi obtenu est déposé sur gel afin d'observer et de comparer les intensités des spots. Un témoin n'ayant subi aucune simulation de stress est utilisé comme témoin.

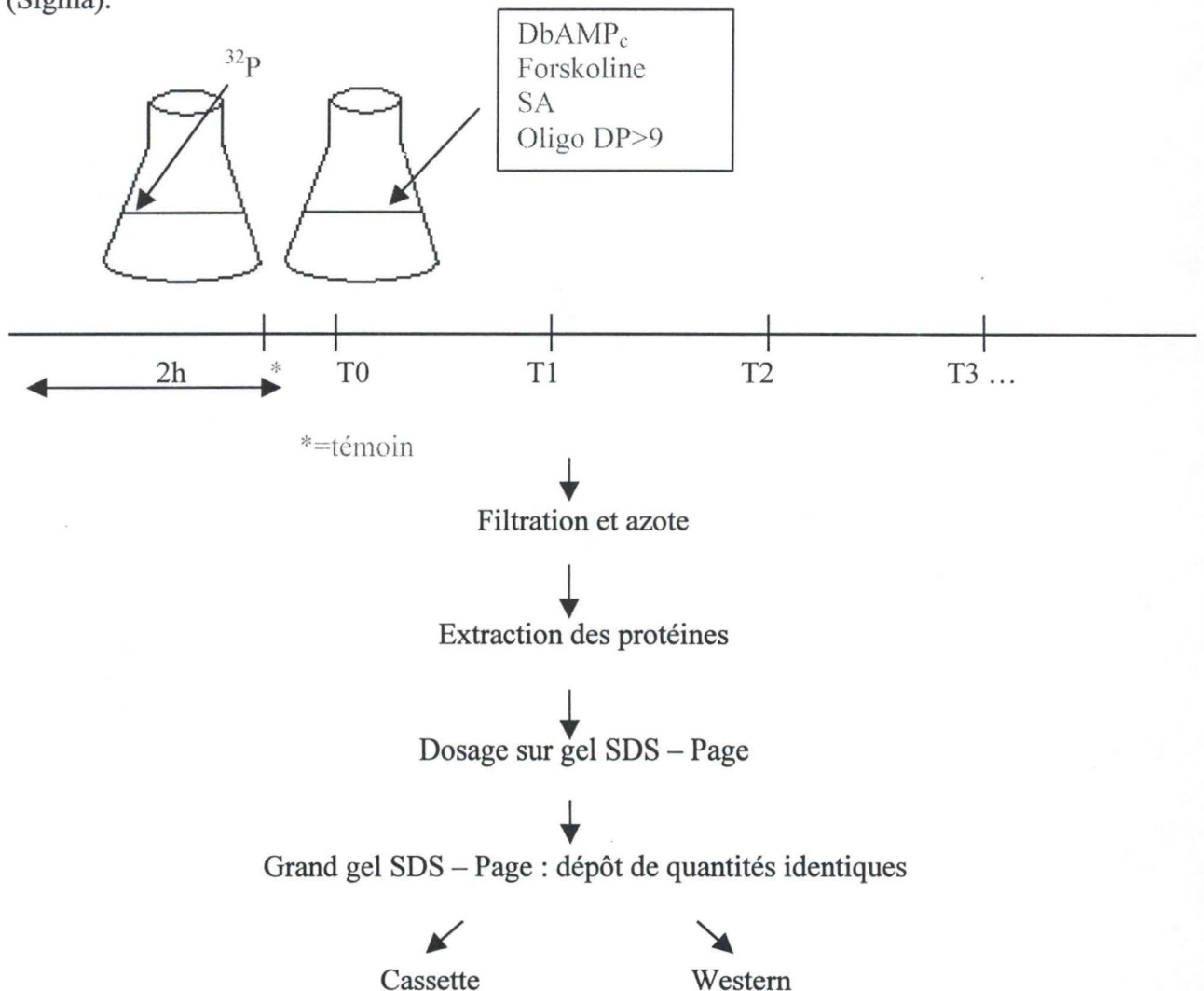


## 5. PROTOCOLE GENERAL DE LA MISE EN EVIDENCE D'UNE MODIFICATION POST- TRADUCTIONNELLE DE CREB PAR PHOSPHORYLATION IN VIVO. (FIGURE 18)

Des cultures cellulaires de tabac BY-2 de 3 jours ont été préincubées pendant 2 heures avec du phosphate inorganique marqué permettant l'assimilation du  $^{32}\text{P}_i$  dans les cellules.

Ces suspensions ont subi ensuite des simulations de stress : par la forskoline (100  $\mu\text{M}$ ), le dibutyryl-AMPc (100  $\mu\text{M}$ ), l'acide salicylique (250  $\mu\text{M}$ ) ou les oligopectates de DP $\geq$ 9 (0.2 mg/ml). Après un des traitements, une aliquote de 10 ml de suspension cellulaire est prélevée, filtrée et plongée dans l'azote liquide à différents temps. On a extrait ensuite de ces cellules les protéines totales qui ont été dosées afin d'y déposer une quantité équivalente dans chaque puits lors de deux séries de gel SDS-Page contenant les différentes simulations de stress.

Un Western blot est réalisé sur une première série de gels afin de détecter la présence ou non de la protéine CREB à l'aide d'anticorps anti-CREB. Enfin, la deuxième série de gels est mise en cassette pendant 6 jours avec un film Kodak XAR-5 (Sigma).





*IV. Résultats et discussion.*

## 1. RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

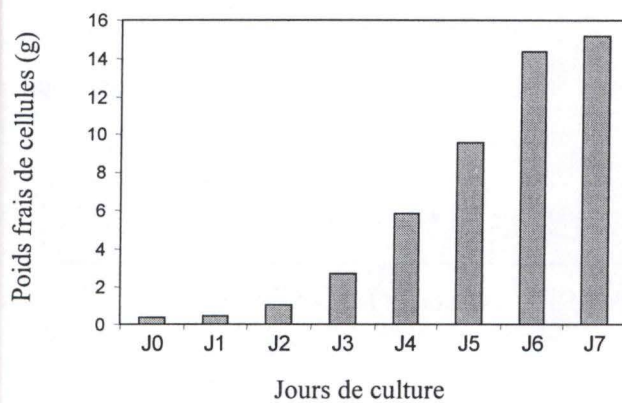
Bellefontaine (1995) a réalisé le clonage et le séquençage d'ADNc codant pour des protéines b-ZIP végétales homologues au facteur de transcription CREB. Deux fragments d'isoformes de CREB, l'un de 546 bp (CREB-A) et l'autre de 488 bp (CREB-B) ont ainsi été isolés chez *Cichorium intybus*. Draye (1998) a ensuite sous-cloné les séquences CREB-A et CREB-B dans un vecteur d'expression pET-15b permettant la surexpression des protéines d'intérêt dans E. Coli. Ces protéines ont été injectées à des lapins et des anticorps anti-CREB ont été produits. Ces derniers reconnaissent des protéines de chicorée dont le poids moléculaire correspond à celui

## 2. RAPPEL DES OBJECTIFS DU MEMOIRE

attendu pour les protéines CREB végétales (40 - 50 kDa).

Le but de ce mémoire est de vérifier l'activation (ou non) du facteur de transcription CREB-Au niveau transcriptionnel et/ou post-traductionnel en présence de molécules activant ou mimant l'activation de la voie de l'AMPc (forskoline et dibutyryl, -AMP<sub>c</sub> respectivement); et, en présence de substances simulant un stress pathologique (l'acide salicylique et les oligopectates de degré de polymérisation  $\geq 9$ ).

Pour ce faire, des analyses par Northern blot et RT-PCR "semi-quantitative" seront utilisées afin de mesurer les variations du taux de transcription des gènes CREB; tandis que des expériences de phosphorylation *in vivo* en présence de <sup>32</sup>P inorganique et des analyses en western blot seront combinées pour mettre en évidence des modifications post-traductionnelles des protéines CREB.



**Figure 19 : Evolution du poids frais des suspensions cellulaires BY-2 au cours de la culture.**

Les points J0 à J7 représentent le poids frais en grammes de cellules issues de cultures en suspension de 80 ml après 0 à 7 jours suivant repiquage.



### 3. LE MODELE EXPERIMENTAL : LA CULTURE EN SUSPENSION DE CELLULES DE TABAC (SOUCHE BY-2).

La culture en suspension de tabac BY-2 a été initiée d'un cal induit au départ de semences de *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 (Nagata *et al.*, 1992). Cette lignée cellulaire possède un taux de croissance très élevé (multiplication par un facteur 80 à 100 fois en une semaine), présente une grande homogénéité et est classiquement qualifiée de lignée synchronisée dû à son indice mitotique de 10 à 20 % (Nagata *et al.*, 1992). Dans le cadre de ce mémoire, l'utilisation d'une culture en suspension facilite l'application des molécules précitées et permet une stimulation simultanée de toutes les cellules (ce qui n'est pas le cas avec une plante entière).

Avant de passer à l'étude du facteur CREB, il a été nécessaire de définir le temps optimal de culture permettant de disposer de suffisamment de matériel végétal pour les différentes extractions d'ARN et de protéines qui devront être réalisées durant ce mémoire.

Pour cela, la densité cellulaire de plusieurs cultures en suspension de tabac BY-2 a été "mesurée" pendant les 7 jours qui suivent leur repiquage. Chaque jour, une culture cellulaire a été prélevée, filtrée sous vide et pesée. La *figure 19* montre que le poids frais des cellules après filtration augmente fortement à partir du troisième jour (J3) jusqu'à J6 avant de se stabiliser.

Dans les expériences qui vont suivre, des cellules J3 seront utilisées. Ce choix est un compromis entre une densité cellulaire suffisante, les exigences propres à chaque protocole utilisé au cours de ce mémoire, et le temps disponible pour la réalisation de ce travail.

## 4. ANALYSE DES VARIATIONS DU TAUX DE TRANSCRIPTION DE CREB

La mise en évidence de la transcription d'un gène peut être étudiée à l'aide de deux méthodes, couramment utilisées, que sont l'analyse en Northern blot et la RT-PCR.

La première de ces techniques présente l'avantage de permettre une quantification aisée du taux de transcription d'un gène et de rendre compte, avec fiabilité des variations de ce taux. Malgré cela, le faible seuil de sensibilité de cette technique et sa lourdeur, en font une méthode de plus en plus délaissée au profit d'une technique plus rapide et plus sensible : la RT-PCR. Elle nécessite, par contre, une mise au point plus fastidieuse avant de pouvoir quantifier convenablement des transcrits., Dans un premier temps nous lui avons donc préféré l'analyse par Northern blot.

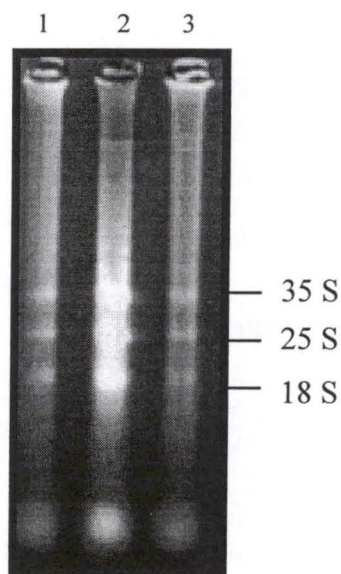
### 4.1 Essai de détection du niveau de transcription de CREB par Northern blot

La technique de Northern blot peut être décomposée en plusieurs étapes : l'extraction d'ARN et le transfert sur membrane de nylon, le marquage de la sonde, et enfin l'hybridation de la sonde et sa révélation. Pour chacune de ces étapes, des contrôles ont été réalisés.

#### 4.1.1 Réalisation du Northern blot.

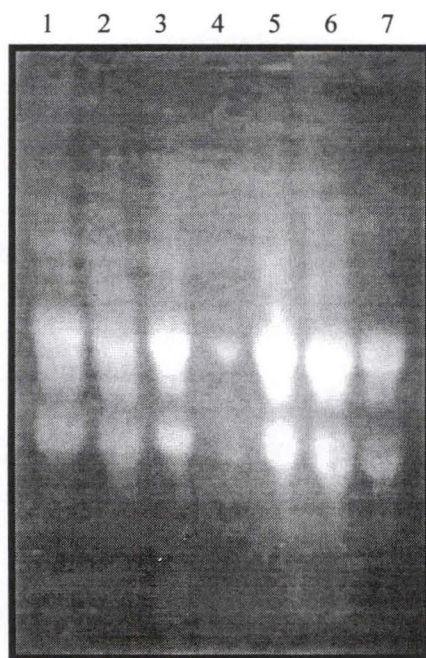
Avant d'entreprendre une étude de la régulation du facteur CREB au niveau transcriptionnel, il était nécessaire de vérifier si le choix de cette technique était adéquat. Pour ce faire, de l'ARN total de cellules de tabac prélevées au cours de la cinétique de culture (J0 à J6) a été utilisé. Ces ARN ont été dosés par spectrophotométrie et leur qualité vérifiée sur gel d'agarose. La *figure 20* présente 3 extractions indépendantes d'ARN. Les bandes les plus intenses correspondent aux ARN 18S, 28S et 35S, respectivement.

Pour le Northern blot des quantités identiques d'ARN (18 µg) ont été déposées sur gel d'agarose dénaturant.



**Figure 20 : Vérification des extractions d'ARN total au Trizol® (Amersham).**

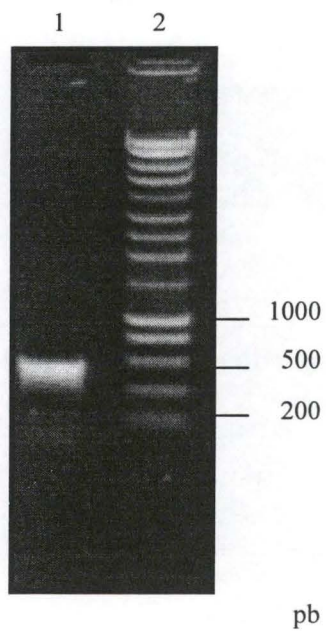
Trois aliquotes d'ARN totaux issues de trois extractions différentes ont été déposées sur gel d'agarose 1 % (puits 1, 2 et 3). Les trois bandes majoritaires correspondent aux ARN 18S, 25S et 35S.



**Figure 21 : Vérification de la présence d'ARN sur la membrane de nylon.**

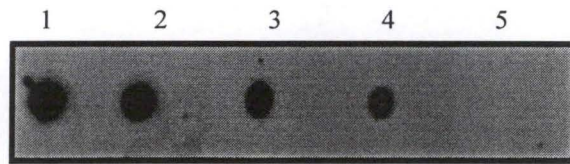
Après avoir effectué le transfert des ARN d'un gel d'agarose 1 % vers une membrane de nylon, cette dernière a été analysée aux UV afin de confirmer le transfert. Les dépôts correspondent à de l'ARN total de cellules de tabac BY-2 prélevées à différents jours de culture de J0 à J7 (puits 1 à 7, respectivement).





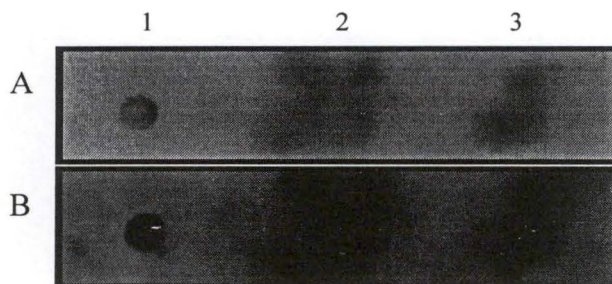
**Figure 22 : Vérification de la réaction de PCR lors du marquage de la sonde à la biotine.**

5  $\mu$ l de la réaction de PCR de CREB A ont été déposée sur un gel d'agarose 1 % dans le puit 1. Le puit 2 contient le marqueur de poids moléculaire.



**Figure 23 : Vérification du marquage à la biotine de la sonde CREB A.**

Des aliquotes de sonde marquée à la biotine ont été déposées sur une membrane de nylon. Cette dernière a été révélée à l'aide du kit CDP-star (Biolabs) puis exposée 20 minutes avec un film autoradiographique. Les dépôts 1 à 5 correspondent respectivement à des dilutions de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , et  $10^{-5}$  fois.



**Figure 24 : Vérification de la reconnaissance de la sonde CREB A avec de l'ADN génomique de chicorée et de tabac.**

Sur une membrane de nylon sont déposés: 1  $\mu$ g du clone CREB A (dépôt 1), 5  $\mu$ g d'ADN génomique de tabac (dépôt 2) et de chicorée (dépôt 3). Après des étapes de préhybridation et hybridation avec la sonde, cette membrane est révélée à l'aide du kit CDP-star (Biolabs) puis exposée 20 minutes (A) ou 60 minutes (B) avec un film autoradiographique.

Après migration, les ARN totaux ont été transférés sur une membrane de nylon *figure 21*. La présence de bromure d'éthidium dans les échantillons nous a permis de vérifier l'efficacité du transfert. Comme le montre la *figure 21*, l'intensité des spots est constante pour chaque puit (sauf à J3 où nous avons rencontré un problème lors du dépôt).

#### 4.1.2 Marquage des sondes CREB à la biotine.

La mise au point du marquage à la biotine a été réalisée avec la séquence CREB-A. Celle-ci a été réalisée au départ du clone plasmidique contenant la séquence de CREB-A (Bellefontaine 95). Le marquage a été effectué par réaction PCR en présence de dCTP biotinylés / non biotinylés dans des proportions 1:2. Un contrôle positif réalisé en présence de dCTP non biotinylés a été ajouté lors de cette réaction PCR. Les paramètres d'amplification utilisés sont repris dans le tableau ci-dessous :

Etape	Temps (min.)	Température (°C)	Répétition
Dénaturation	1minute	94°C	1X
Dénaturation	1minute	94°C	29X
Hybridation	1 minute	55°C	
Elongation	3 minutes	68°C	
Terminaison	10 minutes	68°C	1X

Après amplification, l'échantillon contrôle a été analysé sur gel d'agarose 1 % *figure 22*. La présence d'une bande correspondant aux 500 bp attendues confirme l'efficacité de la PCR.

#### 4.1.3 Vérification du marquage de la sonde

Des analyses en dot blot nous ont permis de vérifier le marquage de la sonde. Pour ce faire, la sonde CREB-A marquée à la biotine a subi 5 dilutions de 10 en 10 et une aliquote de chacune des dilutions a été déposée sous forme de dot sur une membrane de nylon. Après les étapes de révélation et une exposition de 20 minutes de la membrane sur film autoradiographique, nous avons constaté que la sonde a bien été marquée à la biotine (*figure 23*).



#### 4.1.4 Vérification de la reconnaissance de l'ADN génomique de *Nicotiana tabacum* par la sonde (figure 24)

La sonde CREB-A provenant d'ADN génomique de chicorée, nous avons voulu vérifier si elle pouvait également reconnaître CREB dans l'ADN génomique de tabac (notre outils pour cette étude). Cette vérification a également été effectuée par analyse en dot blot. Pratiquement 5 ng d'ADN génomique de tabac (dépôt 2) et de chicorée (dépôt 3) ont été déposés sur une membrane de nylon. Le clone CREB du plasmide d'origine a été introduit dans le test comme contrôle positif (dépôt 1). Cette membrane a ensuite été soumise aux conditions de pré-hybridation, d'hybridation, de lavages, et de révélation CREB-A décrites pour le Northern blot. Les résultats obtenus montrent que la sonde s'hybride, à la fois, à de l'ADNg de chicorée et de tabac. Maintenant que nous disposons d'un protocole de Northern blot opérationnel, nous pouvons passer à l'analyse des variations du taux de transcription de CREB dans les cellules de tabac.

#### 4.1.5 Résultats du Northern blot

La membrane de nylon supportant les ARN totaux J0 à J6 a été hybridée avec la sonde CREB-A précédemment testée. Les résultats obtenus après hybridation et lavage ont toujours été négatifs et ceci malgré les résultats positifs des différents contrôles effectués à chaque étapes du protocole.

Le Northern ne permet donc pas une détection optimale du facteur de transcription CREB. Puisque le protocole de Northern blot a été réalisé dans de bonne conditions, il est donc nécessaire de rechercher ailleurs l'origine de résultat négatif. Il est utile de rappeler qu'un facteur de transcription tel que CREB n'est généralement pas (ou rarement) induit au niveau transcriptionnel et que, par conséquent la quantité d'ARN codant par cette protéine est relativement faible dans la cellule.

Pour essayer de résoudre ce problème, nous avons utilisé la RT-PCR "semi-quantitative", une technique connue pour être plus sensible que les Northern blot et donc mieux adaptée à notre problème.

## **4.2 Mise au point de la technique de RT-PCR "semi-quantitative" sur notre matériel**

### **4.2.1 Généralités:**

Différentes techniques RT-PCR sont actuellement décrites dans la littérature. Elles peuvent être classées en 2 catégories. Les RT-PCR dites qualitative telles que la "RT-PCR classique" et la "*RT-PCR in situ*" (Woo, 95); et, les RT-PCR dites quantitative telles que la "RT-PCR quantitative" (Freeman, 99) et la "RT-PCR semi-quantitative".

Deux impératifs ont guidé notre choix pour la technique à utiliser : la nécessité d'une quantification du niveau des transcrits et d'une mise au point rapide de la technique. La RT-PCR semi-quantitative offrait un compromis honorable entre ces 2 critères.

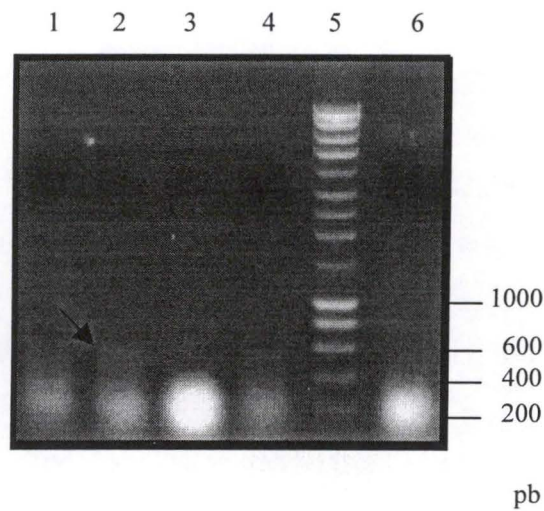
Le principe de la RT-PCR consiste à mettre en évidence des différences quantitatives dans plusieurs populations de ADNc obtenues au départ d'une même quantité d'ARN totale (4 µg dans notre cas) grâce à une reverse transcriptase. Ces différences observées au niveau de l'amplification PCR reflètent des différences dans le taux de transcription des gènes étudiés.

L'utilisation d'un standard externe lors de la RT-PCR permet de lui attribuer le nom de RT-PCR semi-quantitative. Le standard externe consiste en la réalisation d'une RT-PCR à l'aide d'amorces d'un gène exprimé de manière constitutive (l'ubiquitine dans notre cas) sur le même échantillon d'ADNc utilisé pour étudier la transcription du gène d'intérêt. L'amplification est réalisée dans un tube différent du tube où a lieu l'amplification du gène étudié (à la différence du "standard interne" qui caractérise la RT-PCR quantitative). Ainsi sur différentes populations d'ARN, au départ d'une même quantité d'ARN total et dans les mêmes conditions de synthèse d'ADNc et d'amplification PCR, ce standard doit être amplifié de manière identiques dans tous les échantillons. Ce dernier sera donc le témoin du "bon fonctionnement" de la technique de RT-PCR.

### **4.2.2 Premiers essais :**

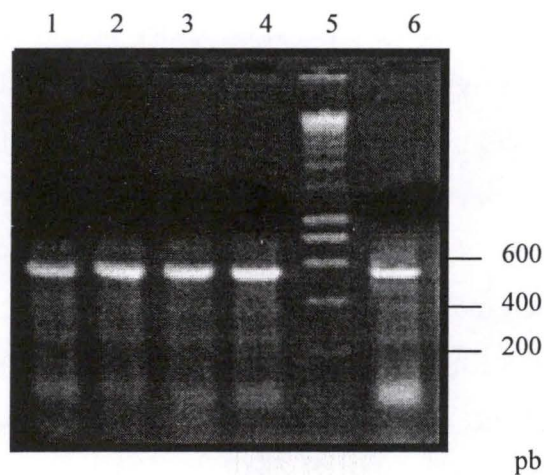
Les premiers essais de RT-PCR ont été réalisés sur de l'ARN total extrait de cellules J3 non stimulées et stimulées, durant des temps de 5 à 20 minutes, avec de





**Figure 25 : Résultat des premiers essais de RT-PCR avec 25 cycles d'amplification.**

Des ARN issus de cellules stimulées par l'acide salicylique durant 5, 10, 15, et 20 minutes (puits 1 à 4) ou non stimulées (puit 6) ont subi une RT-PCR comprenant 25 cycles d'amplification. Une aliquote de 5  $\mu$ l du produit de cette réaction a été déposée sur gel d'agarose 1%. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 5.



**Figure 26 : Résultat des premiers essais de RT-PCR avec 50 cycles d'amplification.**

Des ARN issus de cellules stimulées par l'acide salicylique durant 5, 10, 15, et 20 minutes (puits 1 à 4) ou non stimulées (puits 6) ont subi une RT-PCR comprenant 50 cycles d'amplification. Une aliquote de 5  $\mu$ l du produit de cette réaction a été déposée sur gel d'agarose 1%. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 5.



l'acide salicylique (voir également approche pharmacologique) et ceci à l'aide des amorces CREB-A. Ces premières conditions PCR comprenaient 25 cycles d'amplification. Les premiers résultats obtenus (*figure 25*) montrent que seul l'échantillon RT-PCR correspondant aux cellules J3 stimulées pendant 10 minutes à l'acide salicylique était légèrement positif.

Afin de vérifier si le nombre de cycles d'amplifications était suffisant, nous avons ré-amplifié les échantillons PCR de la *figure 25* par 25 cycles supplémentaires. Après ces 50 cycles d'amplification, CREB-A a bien été amplifiée mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les cellules non traitées et les cellules traitées à l'acide salicylique (*figure 26*).

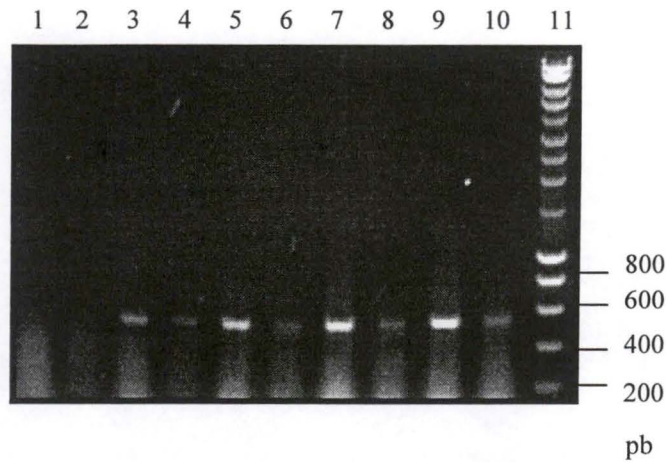
Ces résultats nous indiquent soit que l'acide salicylique n'a aucun effet sur la transcription du gène CREB, soit que la détection d'éventuelles différences est rendue impossible par un nombre trop important de cycles d'amplification. En effet, lors d'une amplification PCR, la quantité d'amplicons augmente de manière exponentielle avant d'atteindre un plateau dû à l'épuisement des dNTP et des amorces, à la dénaturation de la Taq polymérase et à la compétition entre amorces et amplicons.

#### **4.2.3 Effet de la variation du nombre de cycles d'amplifications PCR :**

Nous avons recommencé les mêmes expériences qu'au point précédent, avec de l'ARN de cellules stimulées ou non par l'acide salicylique (10 minutes), en variant le nombre de cycles d'amplification. Pratiquement, après 25 cycles d'amplification, la PCR a été stoppée et 5 µl d'échantillon ont été prélevés et analysés sur gel d'agarose 1%. Parallèlement, la PCR a été redémarrée et des échantillons ont été prélevés tous les 5 cycles jusqu'à 45 cycles. L'analyse des produits d'amplification (*figure 27*) montre, cette fois-ci, une nette différence entre cellules non traitées et traitées durant 10 minutes à l'acide salicylique et ceci à partir de 35 cycles d'amplification. Une variation plus importante est observée après 40 et 45 cycles. Cette expérience a fait l'objet d'une répétition et les résultats ont été identiques, nous permettant ainsi de conclure à une certaine reproductibilité de la méthode.

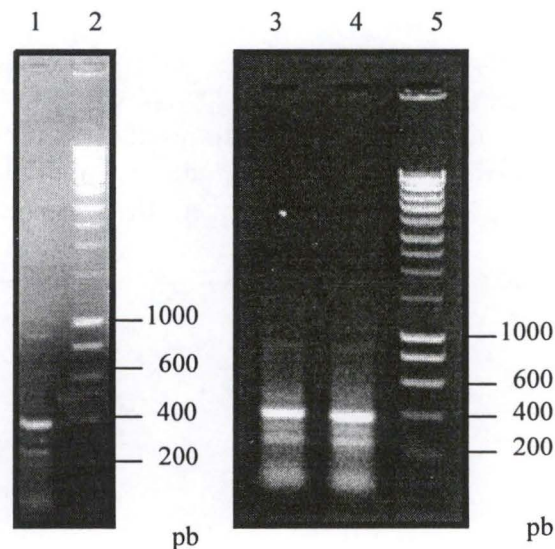
Cette mise au point faite, nous réaliserons désormais toutes nos RT-PCR avec 40 cycles d'amplification.

Remarque : Dans la suite des expériences, nous n'utiliserons que les amorces permettant l'amplification de CREB-A. Nous avons, en effet, constaté que les amorces CREB-B



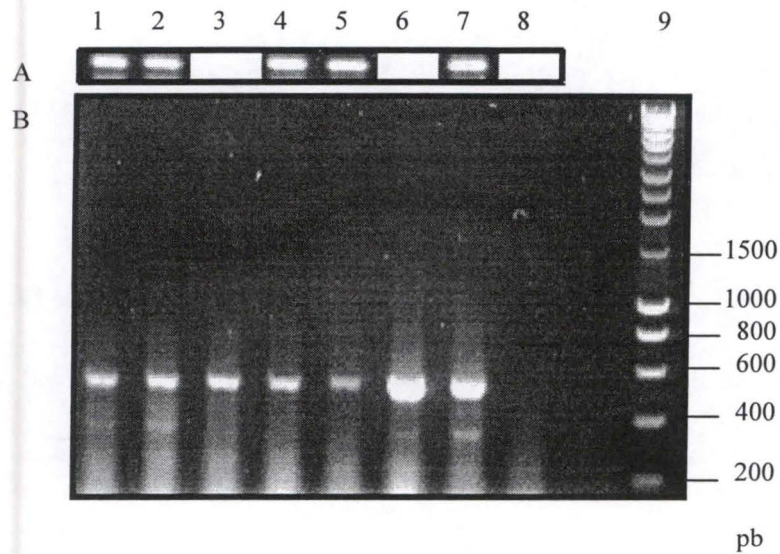
**Figure 27 : Effets de la variation du nombre de cycles d'amplification PCR sur l'ADNc.**

Des ARN issus de cellules stimulées par l'acide salicylique durant 20 minutes (puits 2, 4, 6, 8 et 10) ou non stimulées (puits 1, 3, 5, 7 et 9) ont subi une RT-PCR. Les durées des cycles d'amplification sont de 25 (puits 1 et 2), 30 (puits 3 et 4), 35 (puits 5 et 6), 40 (puits 7 et 8) et 45 (puits 9 et 10). Une aliquote de 5  $\mu$ l du produit de cette réaction a été déposé sur gel d'agarose 1%. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 11.



**Figure 28 : Mise au point de la RT-PCR avec les amorces de l'ubiquitine.**

Trois températures d'hybridations différentes ont été testées avec ces amorces : 55°C (puit 1), 57°C (puit 3), et 59°C (puit 4). Une aliquote de 5  $\mu$ l de la réaction a été déposée dans un gel d'agarose 1%. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans les puits 2 et 5.



**Figure 29 : Etude des taux de transcription de CREB A au cours de la culture des cellules de tabac BY-2.**

Les ARN totaux de cultures cellulaires de tabac BY-2 ont été extraits à différents jours de culture. Après RT-PCR avec les amorces de l'ubiquitine (Figure A) ou de CREB A (figure B), 5  $\mu$ l du produit de la réaction ont été déposés sur gel d'agarose 1% pour chacun des échantillons de J0 à J7 respectivement dans les puits 1 à 8. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 9.



présentaient un manque de spécificité sur l'ADNc de tabac BY-2. Par manque de temps, de nouvelles amorces CREB-B n'ont pas été utilisées dans ce travail.

Comme nous l'avons déjà évoqué, une quantification par l'utilisation de la méthode de RT-PCR n'est fiable que si un standard est réalisé. La dernière étape de la mise au point de la technique a donc été de déterminer les conditions optimales d'amplification du standard.

#### **4.2.4 Standard externe :**

Nous avons choisi d'utiliser l'ubiquitine pour vérifier l'homogénéité des amplifications RT-PCR. Après alignement de séquences d'ubiquitine de différents génomes et définitions d'amorces se trouvant dans des régions hautement conservées (voir séquences des amorces au point x), 3 températures d'hybridation ont été testées afin de réaliser une amplification optimale. La *figure 28* présente les résultats de ces amplifications à 55°C, 57°C et 59°C. La bande attendue d'environ 400 pb est bien présente pour chacune des amplifications mais malgré une augmentation de la température d'hybridation, nous n'avons pas réussi à diminuer le "smear" qui l'accompagne. Nous réaliserons désormais l'amplification avec une température d'hybridation de 55°C.

Les conditions nécessaires à l'amplification par RT-PCR de CREB-A et du standard externe étant mise au point, nous avons testé l'efficacité de la quantification en analysant en parallèle CREB-A et le standard au cours de la croissance des cellules BY-2.

#### **4.2.5 Variation du taux de transcription de CREB au cours de la croissance des cellules BY-2**

Une réaction RT-PCR a été réalisée sur chaque échantillon d'ARN total extrait durant la culture des cellules de tabac BY-2 (J0 à J7). Cette expérience permet, à la fois, de vérifier la variation du taux de transcription de CREB-A et de valider le choix du standard externe.

L'analyse des produits RT-PCR sur gel d'agarose 1 % (*figure 29*) permet de constater que le taux de transcription de CREB-A est assez variable au cours du temps.

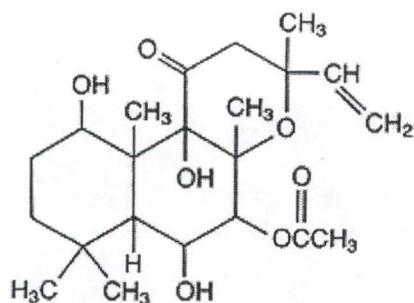


Figure 30 : Structure de la forskoline (Barritt *et al.*, 1994).

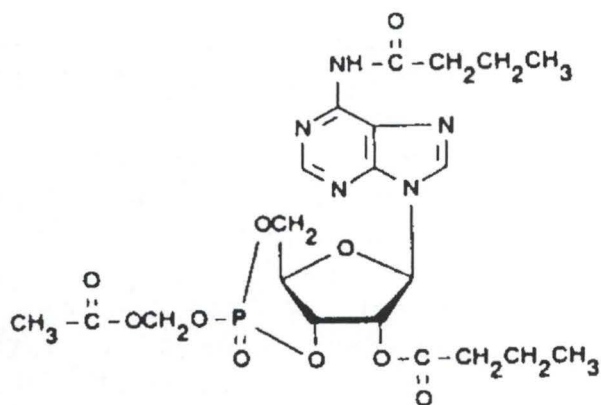
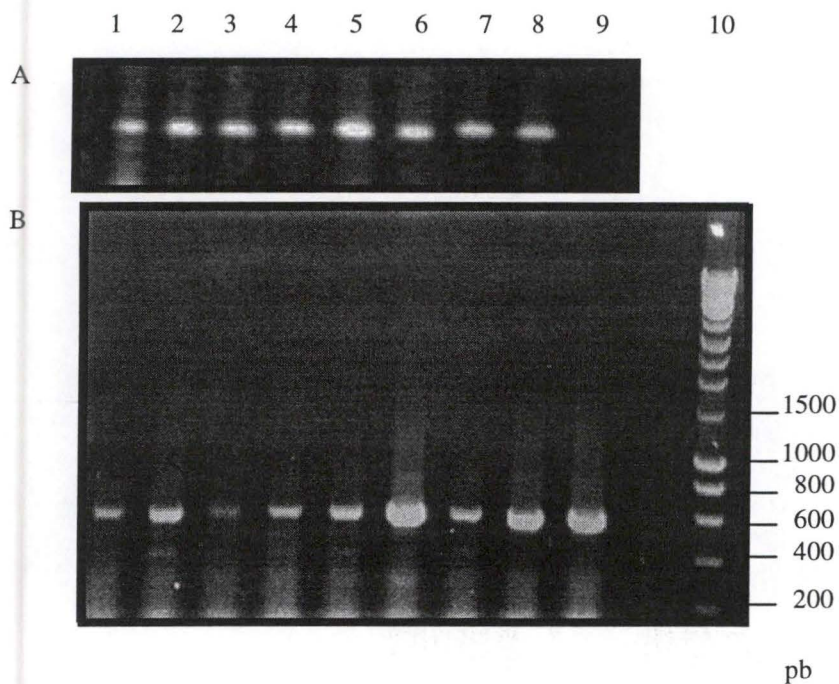


Figure 31 : Structure du dibutyryl AMPc.



**Figure 32 : Etude des taux de transcription de CREB A après différents temps de traitement à la forskoline.**

Les ARN totaux de cultures cellulaires de BY-2 ont été extraits à différents temps après l'application d'un traitement à la forskoline (100  $\mu$ m). Après RT-PCR avec les amorces de l'ubiquitine (Figure A) ou de CREB A (figure B), 5  $\mu$ l du produit de la réaction ont été déposés sur gel d'agarose 1%. Les puits de 1 à 9 correspondent respectivement aux échantillons traités durant 1, 2, 5, 7, 9, 11, 13, et 15 minutes. Le puits 1 correspond à une amplification RT-PCR de l'ARN total extrait de cultures de 3 jours non traitées. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 10.



Dans les 5 premiers jours, de faibles variations sont constatées. A partir de J6, l'intensité du spot est environ 3 fois plus grande.

Il est assez difficile de donner une explication à une telle variation. En effet, le changement de milieu de culture en début de cinétique ou l'apparition de métabolites secondaires en fin de cinétique sont des facteurs pouvant influencer considérablement le taux de transcription d'un gène.

Ce qui est plus intéressant dans cette cinétique concerne l'amplification réalisée avec les amorces de l'ubiquitine qui, malgré les différences observées au niveau des RT-PCR de CREB-A, est parfaitement constante peu importe le jour de la cinétique. Le choix de l'ubiquitine comme standard externe semble donc être judicieux.

Maintenant que nous disposons d'un protocole de RT-PCR "semi-quantitative" fonctionnel, nous pouvons analyser l'impact de différents modulateurs et autres traitements sur le taux de transcription de CREB-A chez le tabac BY-2.

#### **4.4. Approche pharmacologique: Effet de la forskoline et du dibutyryl-AMPC sur le taux de transcription de CREB-A.**

##### **4.4.1 Généralités sur la forskoline et le dibutyryl AMPC:**

La forskoline (*Figure 30*) est un diterpène extrait de la plante *Coleus forskohlii*. Elle est couramment utilisée afin de simuler une activation de l'AC chez les cellules animales. L'analyse de la structure moléculaire de l'AC révèle la présence de deux domaines catalytiques arrangés en couronne. La transformation de l'ATP en AMPC y est activée quand les deux ions métalliques liés à deux résidus aspartates d'un domaine se juxtaposent à une paire arginine-asparagine de l'autre domaine. La forskoline active l'AC en favorisant la juxtaposition de ces deux domaines en absence de toute autre stimulation.

Le dibutyryl-AMPC est un analogue de l'AMPC simulant une synthèse d'AMPC par l'AC (*figure 31*). C'est une molécule synthétique non chargée diffusant librement au travers de la membrane plasmique. Une fois dans le cytosol, le groupe phosphate du dibutyryl-AMPC, protégé par un groupement ester acétoxy-méthyl, est hydrolysé par des estérases intracellulaires non spécifiques libérant ainsi l'AMPC.

#### **4.4.2 Traitement des cellules BY-2 à la forskoline et au dibutyryl-AMPc.**

Des échantillons de cellules (10 ml de suspension cellulaire) ont été prélevés régulièrement après l'ajout des modulateurs à différents temps (*figure 17*). Les cellules ont été filtrées le plus rapidement possible et plongées dans l'azote liquide ("fixation" du temps de traitement). L'ARN total de chaque échantillon a été extrait par la méthode au Trizol et analysé sur gel et par mesure des rapports  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$ . Quatre  $\mu g$  d'ARN total ont été utilisés pour la synthèse du premier brin de cDNA (first strand cDNA synthesis kit) et la réaction d'amplification. Les produits de RT-PCR ont ensuite été analysés sur gel d'agarose 1 %.

En présence de 100  $\mu M$  de forskoline (*figure 32*), on constate, de manière globale, que le taux de transcription du gène CREB-A est augmenté. Il est cependant encore impossible de donner une interprétation physiologique aux variations observées entre les différents temps de prélèvement des cellules. Notez que la RT-PCR réalisée avec des amorces de l'ubiquitine donne des résultats identiques pour tous les échantillons testés.

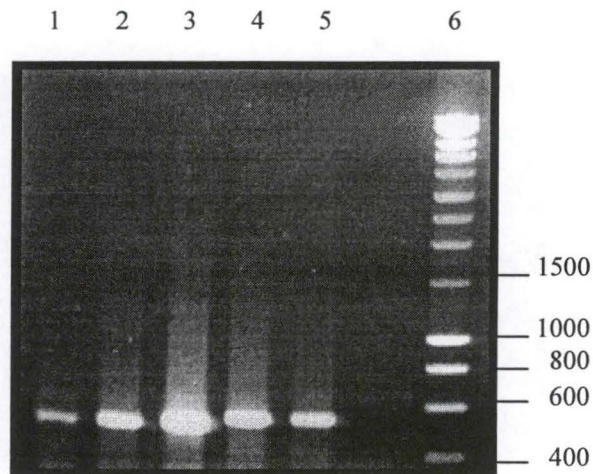
En présence de 100  $\mu M$  de dibutyryl-AMPc (*figure 33*), le taux de transcription de CREB-A augmente fortement jusqu'à 5 minutes avant de diminuer progressivement jusqu'à 15 minutes. L'effet observé semble être davantage marqué par rapport à l'effet de la forskoline.

### **4.5. Effet d'une simulation de stress sur le taux de transcription de CREB-A.**

#### **4.5.1 Généralités sur l'acide salicylique et les oligopectates de DP $\geq 9$**

Nous avons décidé de traiter les cellules de tabac BY-2 avec de l'acide salicylique et des oligopectates de DP  $\geq 9$ , deux molécules-signal accumulées au cours de certaines interactions plante-pathogène. Ces deux molécules sont connues pour déclencher des réponses de défense chez la plante.

L'acide salicylique est un composé phénolique, synthétisé au départ de la voie des phénylpropanoïdes et dont la concentration intracellulaire augmente en réponse à une attaque pathogène. Cette réponse est parallèle à la synthèse de lignine et de phytoalexines, deux autres réponses de défense de la plante. L'acide salicylique favorise

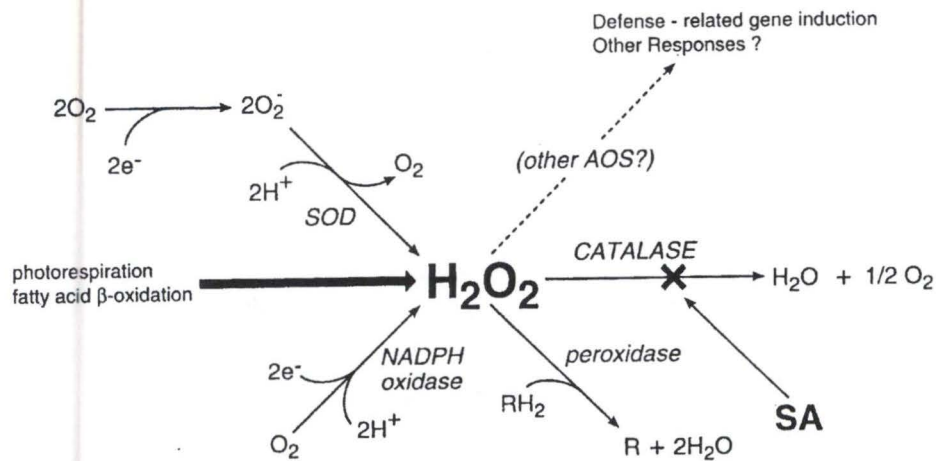


pb

**Figure 33 : Etude des taux de transcription de CREB A après différents temps de traitement au dibutyryl-AMPC.**

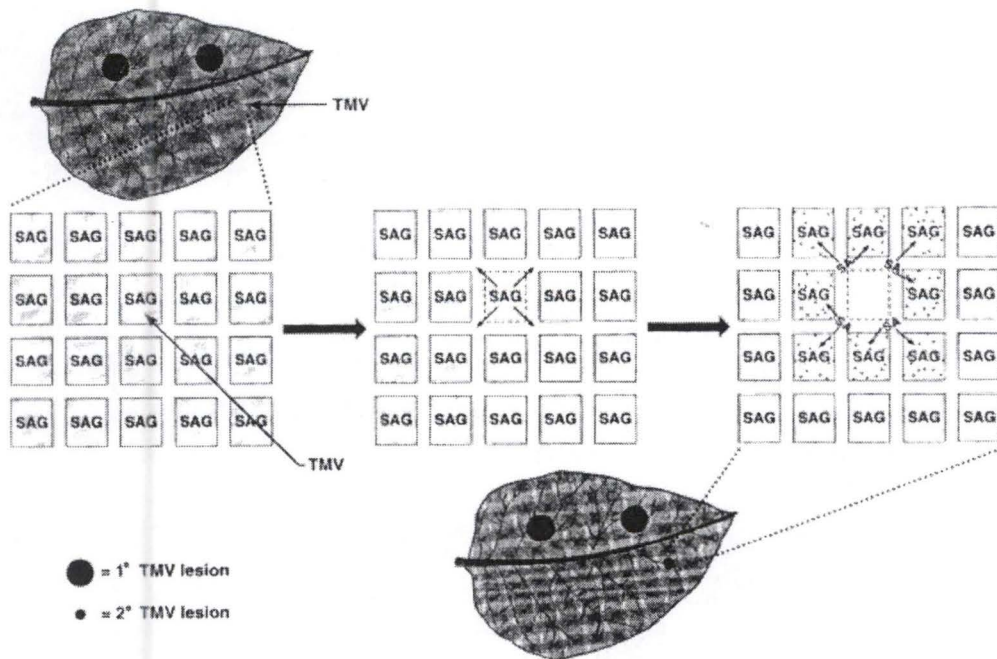
Les ARN totaux de cultures cellulaires de BY-2 ont été extraits à différents temps après l'application d'un traitement au dibutyryl-AMPC (100  $\mu$ M). Après RT-PCR avec les amorces de CREB A, 5  $\mu$ l du produit de la réaction sont déposés sur gel d'agarose 1%. Les puits de 2 à 5 correspondent respectivement aux échantillons traités durant 1, 5, 10, et 15 minutes. Le puit 1 correspond à une culture de 3 jours non traitée. Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans le puit 6.





**Figure 34 : Métabolisme du peroxyde d'hydrogène chez les plantes.**

Lors d'une attaque pathogène sur la plante, l'acide salicylique inhibe les catalases et les ascorbates peroxydases cellulaires, favorisant une accumulation intracellulaire en peroxyde d'hydrogène (Klessig *et al.*, 1994).



**Figure 35 : Modèle du rôle du SAG (SA glucoside) dans la résistance acquise.** La première infection du tabac par le TMV se manifeste par de larges lésions sur la feuille supérieure, alors qu'une seconde infection par le TMV se manifeste sur la feuille du bas par le développement de lésions secondaires plus petites caractéristiques de la réponse acquise. L'acide salicylique, synthétisé lors de la première infection, s'accumule sous forme de glucoside inactif. Ce dernier peut ensuite être libéré rapidement lors d'une nouvelle action via l'action d'une glucosidase. (Klessig *et al.*, 1994).

le choc oxydatif au sein des cellules directement en contact avec un agent pathogène. Pour ce faire, il est capable d'inhiber les catalases et les ascorbates peroxydases cellulaires et, donc, de favoriser l'accumulation de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier assure, entre autres, les fonctions de messagers secondaires et déclenchent la synthèse de phytoalexines et de protéines liées à la pathogenèse (protéines PR) (*figure 34*).

L'acide salicylique participe également à la protection systémique de la plante (*figure 35*). En effet, l'acide salicylique synthétisé lors de la primo-infection est stockée dans la paroi cellulaire sous la forme de glucoside inactif. Lors d'une seconde infection, une  $\beta$ -glucosidase pariétale libère l'acide salicylique et permet aux cellules de se défendre plus rapidement et à distance du site d'infection (on parle de réponse acquise à distance).

Les oligopectates, quant à eux, sont des molécules-signal issues de la paroi cellulaire. Ils sont libérés de la paroi par des enzymes (polygalacturonases, pectates lyases) du pathogène et/ou de la plante au cours d'une infection. Ces molécules peuvent, lorsqu'elles ont une certaine taille (degré de polymérisation (DP)  $\geq 9$ ), adopter une conformation dimérique en présence d'ions calcium (Messiaen *et al.*, 1994). Ce complexe dimérique est capable d'être reconnu par les cellules végétales infectées et d'initier les réponses de défense de la plante (Van Cutsem *et al.*, 1994).

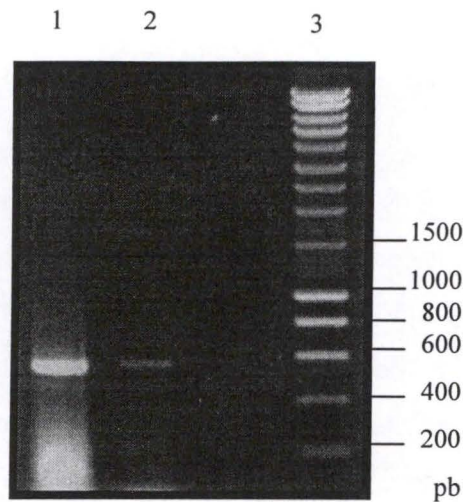
#### **4.5.2. Effet de l'acide salicylique et des oligopectates.**

Une culture en suspension de tabac BY-2 a été traitée avec de l'acide salicylique à une concentration finale de 250  $\mu$ M. Des échantillons de cellules ont été prélevés après 20 minutes de traitement (Zhang *et al.*, 1997).

Dans le cas du traitement aux oligopectates (0.2 mg/ml), les cellules ont été stimulées pendant un laps de temps plus long (jusqu'à 32 heures) puisqu'elles se trouvent être les signaux les plus en amont de la réponse de défense finale (Munoz *et al.*, 1998). Elles ont donc besoin de plus de temps pour traverser la paroi, interagir avec leur récepteur et déclencher une cascade de transduction du signal.

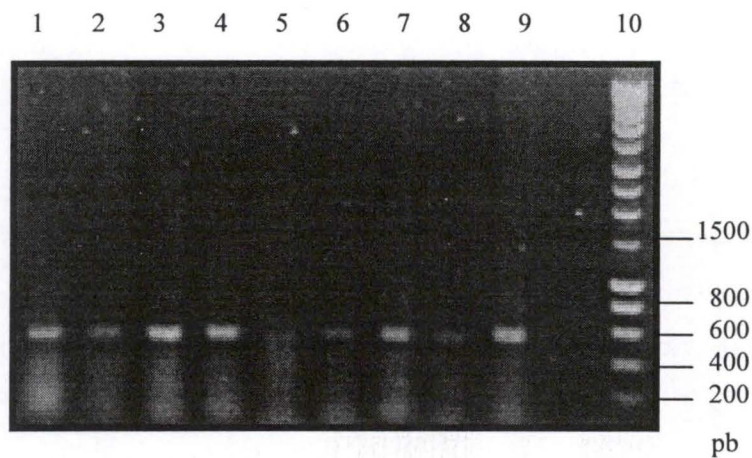
En présence d'acide salicylique (*figure 36*), on constate que le taux de transcription de CREB-A est fortement augmentée par rapport au témoin (J3 non traité) après 20 minutes de traitement. De plus, d'après les expériences de mise au point de la





**Figure 36 : Etude des taux de transcription de CREB A en réponse à un traitement à l'acide salicylique.**

Les ARN totaux d'une culture cellulaire de BY-2 ont été extraits après 20 minutes de traitement à l'acide salicylique (250  $\mu$ M). Après RT-PCR avec les amorces de CREB A, 5  $\mu$ l du produit de la réaction ont été déposés sur gel d'agarose 1% (puit 1). Le puit 2 correspond à l'amplification RT-PCR réalisée sur de l'ARN total extrait à une culture de 3 jours non traitée. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 9.



**Figure 37 : Etude des taux de transcription de CREB A après différents temps de traitement aux oligopectates de DP $\geq$ 9.**

Les ARN totaux de cultures cellulaires de BY-2 ont été extraits à différents temps après l'application d'un traitement aux oligopectates (0.2 mg/ml). Après RT-PCR les amorces de CREB A, 5  $\mu$ l du produit de la réaction ont été déposés sur gel d'agarose 1%. Les puits de 2 à 9 correspondent respectivement aux échantillons traités durant 0.5, 1, 2, 3, 5, 9, 15, et 32 heures. Le puit 1 correspond à une amplification RT-PCR réalisée sur l'ARN total extrait de culture de 3 jours non traitée. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le puit 10.



RT-PCR "semi-quantitative", nous pouvons conclure que dès 10 minutes de traitement une forte augmentation du taux de transcription de CREB-A se produit (*figure 27*).

En présence des oligopectates de  $DP \geq 9$  (*figure 37*), il est assez difficile de tirer des conclusions quant à l'activation ou l'inhibition de la transcription de CREB-A. Il est, en effet, difficile de connaître le "devenir" des oligopectates ajoutés aux cellules : subissent-ils une dégradation au cours du temps ?, les récepteurs d'oligopectates sont-ils toujours présents ou actifs ?

#### **4.6. Conclusion générale concernant l'analyse des variations du taux de transcription de CREB**

Au terme de cette première partie des résultats consacrée à l'analyse des variations du taux de transcription de CREB-A, nous pouvons conclure que la forskoline, le dibutyryl-AMPc et l'acide salicylique sont capables d'induire la transcription du gène CREB-A.

D'un point de vue pratique, la RT-PCR "semi-quantitative" semble être une méthode d'analyse assez convaincante (cfr. standard externe: ubiquitine) permettant une analyse satisfaisante des variations du taux de transcription d'un gène apparemment peu exprimés (cfr. résultats des Northern blots).

Maintenant que nous savons que CREB-A peut-être activé au niveau transcriptionnel par diverses substances, il convient de vérifier si, comme chez les cellules animales, la protéine CREB-A est phosphorylée par ces mêmes substances.

### **5. Etude de l'induction de la phosphorylation du facteur CREB**

La mise en évidence d'une éventuelle phosphorylation du facteur CREB-A nécessite, dans un premier temps, d'identifier ce facteur CREB dans un extrait total de protéines. Nous avons, pour ce faire, utiliser les anticorps anti-CREB produit par Draye et l'analyse des protéines par western blot. Dans un second temps, il convient de détecter la phosphorylation des différentes protéines en présence d'ATP radioactif. Il convient ensuite de vérifier qu'une bande protéique détectée par les anticorps anti-CREB corresponde à une bande protéique radioactive détectée par autoradiographie.

Dans la littérature, deux méthodes sont couramment utilisées pour mettre en évidence la phosphorylation de protéines suite à un traitement quelconque:

- la phosphorylation *in vitro*: cette méthode consiste à stimuler les cellules, d'en extraire les protéines et de mesurer la phosphorylation de ces protéines en présence d'ATP radioactif exogène (mesure post-posée dans le temps).
- la phosphorylation *in vivo*: cette méthode consiste à "nourrir" les cellules avec des ions phosphates radioactifs, qui seront, entre autres, incorporés dans l'ATP. Cette méthode a l'avantage de stimuler des cellules contenant de l'ATP radioactif et d'avoir ainsi une meilleure vision des protéines phosphorylées à un moment donné (Viard *et al.*, 199 ; Droillard *et al.*, 1996).

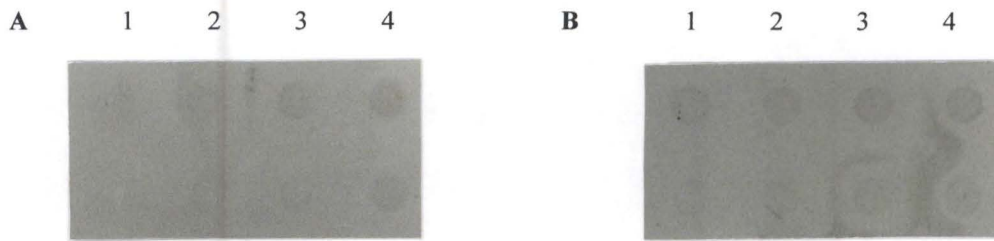
Cette analyse nous a conduit à choisir la deuxième méthode de phosphorylation, plus contraignante que la première, mais plus à même de rendre compte d'une réalité physiologique.

### 5.1 Déroulement de l'expérience (figure 18)

Des cellules de tabac BY-2 du jour J3 ont été préincubées pendant 2 heures (Droillard, 97) avec du phosphate inorganique ( $^{32}\text{P}$ ) (370 MBq/ml de culture) sous agitation constante. Cette préincubation permet l'assimilation du phosphate inorganique par la cellule et l'incorporation de celui-ci dans l'ATP. Ce dernier sera, entre autres, utilisé par des kinases lors de la phosphorylation des protéines.

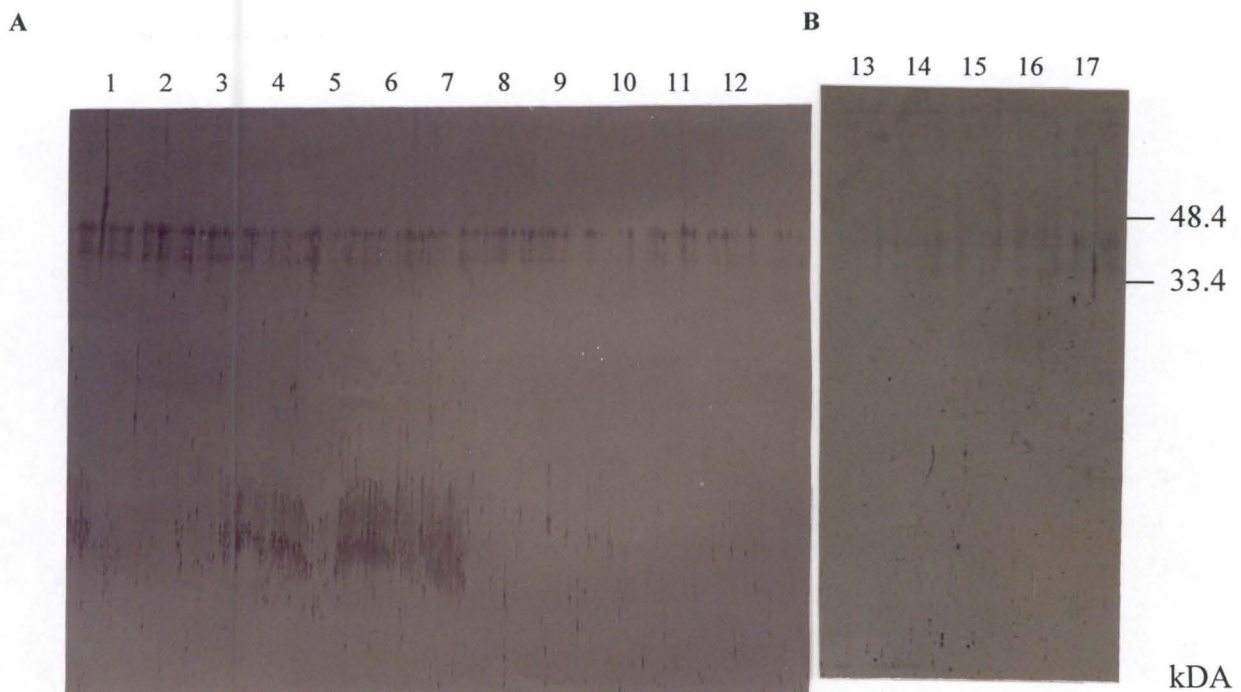
Les cellules ont ensuite été traitées avec de l'acide salicylique (250  $\mu\text{M}$ ), de la forskoline (100  $\mu\text{M}$ ), du dibutyryl-AMPc (100  $\mu\text{M}$ ) et des oligopeptates (0.2 mg/ml) respectivement. De même que pour l'étude de l'activation transcriptionnelle de CREB-A, les temps d'incubation des cellules avec ces substances ont été choisis en fonction de la position de leurs cibles moléculaires dans les voies de transduction du signal.

Après traitement, une aliquote de 10 ml de suspension cellulaire a été prélevée, filtrée et congelée dans de l'azote liquide. Afin de limiter l'action de certaines phosphatases, les protéines totales de chaque échantillon ont été extraites à 4°C dans un



**Figure 38 : Vérification de la spécificité des anticorps contre CREB-A et CREB-B de tabac.**

Des quantités croissantes de protéines de chicorée et de tabac ont été déposées sur membrane de nitrocellulose. Cette membrane a subi les étapes de saturation, d'incubation avec l'anticorps antiCREB-A (A) ou antiCREB-B (B) et de révélation à la peroxydase. Les dépôts 1 à 4 correspondent respectivement à 40, 60, 80 et 100 µg de protéines totales.



**Figure 39 : Détection de CREB A par western blot .**

A : Echantillons traités au dibutyryl-AMPC (100 µM). Les dépôts 2 à 12 correspondent respectivement aux temps de traitement : 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13 et 15 minutes. Le dépôt 1 est un témoin non traité.

B : Echantillons traités à l'acide salicylique (250 µM). Les dépôts de 14 à 17 correspondent respectivement aux temps de traitement : 5, 10, 15 et 20 minutes. Le dépôt 13 est un témoin non traité.



tampon d'extraction supplémenté de 10 mM d'acide okadaïque, 2 % de SDS et de 1 mM d'EDTA.

Afin d'uniformiser les dépôts de protéines dans les expériences de western blot, la concentration en protéines de chaque extrait a été estimée par analyse sur gel SDS-PAGE.

## **5.2 Vérification de la spécificité des anticorps contre CREB-A et CREB-B de chicorée**

Les anticorps anti-CREB produits par Draye ayant été obtenus à partir de protéines de chicorée, il était nécessaire de vérifier la réactivité vis-à-vis d'extraits protéiques de tabac. La *figure 38* présente des blots sur lesquels ont été déposées des protéines de chicorée (A) et de tabac (B) à différentes concentrations (de 40 à 100 µg) après saturation, incubation avec les anticorps respectifs et révélation avec le système à la peroxydase.

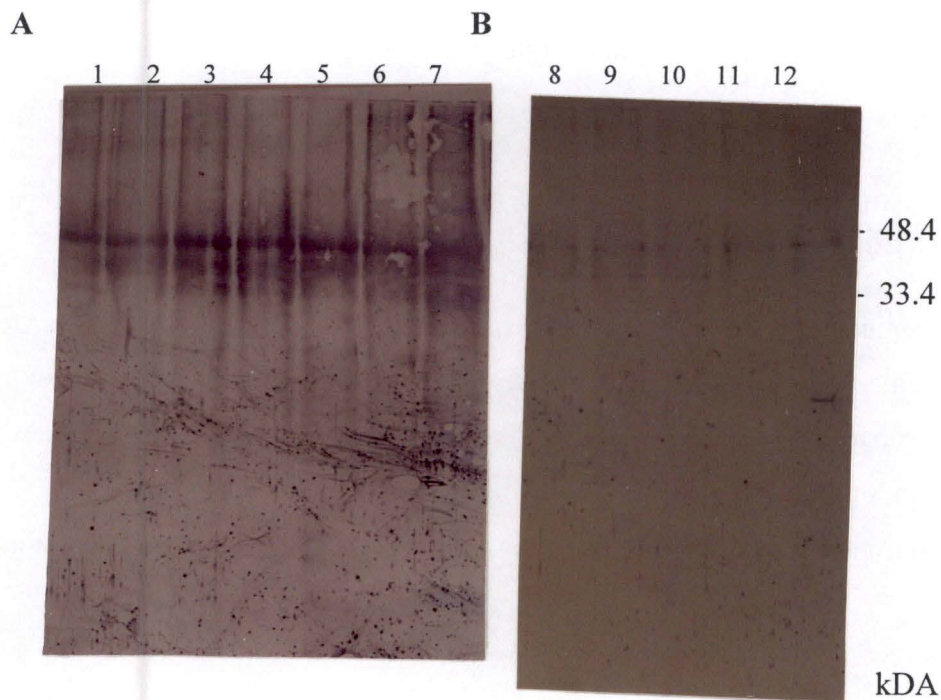
On observe une bonne reconnaissance des protéines de chicorée par les 2 anticorps, ceci pour les quatre quantités de protéines déposées sur la membrane. Dans le cas des protéines de tabac, on constate une limite de détection plus faible pour les deux anticorps : les protéines de tabac ne sont détectées qu'à partir de 80 µg de protéines totales.

A l'issue de cette expérience préliminaire, nous pouvons donc utiliser les anticorps anti-CREB préalablement produits. Aux vues de la plus faible réactivité de ces anticorps en présence de protéines de tabac, nous utiliserons 200 µg de protéines totales par puits dans les expériences de western blot.

## **5.3 Détection du facteur CREB par western blot**

Les extraits protéiques des différents échantillons traités (200 µg) ont été analysés par western blot. Les *figures 39 (A, B) et 40 (A, B)* présentent les membranes de nitrocellulose après saturation, incubation avec l'anticorps anti-CREB-A et révélation avec le système à la peroxydase.

Pour les quatre types de traitement (acide salicylique, dibutyryl-AMPc, oligopectatse et forskoline), deux bandes majoritaires correspondant à des protéines d'environ 38 kDa et 42 kDa sont détectées. Leur détection est constante au cours du temps et indépendante du traitement appliqué aux cellules.



**Figure 40 : Détection de CREB A par western blot .**

A : Echantillons traités à la forskoline (100 μM). Les dépôts de 2 à 7 correspondent respectivement aux temps de traitement : 1, 2, 7, 8, 9 et 11 minutes. Le dépôt 1 est un témoin non traité.

B : Echantillons traités aux oligopectates (0.2 mg/ml). Les dépôts de 9 à 12 correspondent respectivement aux temps de traitement : 0.5, 1, 2, 4 heures. Le dépôt 8 est un témoin non traité.

La détection de deux bandes protéiques peut avoir plusieurs origines:

- réactions croisées de chaque anticorps .Par exemple, l'anticorps anti-CREB-A peut reconnaître CREB-A et CREB-B (cfr également Draye 1998)
- l'épissage alternatif de CREB (cfr introduction)
- la formation d'un complexe entre CREB et une autre protéine résultant en un retard sur gel

Maintenant que nous savons où se trouve(nt) la(les) protéine(s) détectée(s) par l'anticorps anti-CREB-A, il ne nous reste plus qu'à vérifier si des protéines ont été phosphorylées *in vivo*.

## **5.4 CREB-A est-il phosphorylé?**

Pour rappel, la pré-incubation des cellules avec des phosphates inorganiques permet une analyse directe des phénomènes de phosphorylation après, dans notre cas, un stimulus à l'acide salicylique, la forskoline, le dibutyryl ou les oligopectates. Les différents échantillons analysés par western blot ont été analysés, en parallèle, par autoradiographie. Les *figures 41 (A, B) et 42 (A, B)* présentent les autoradiographies pour les différents échantillons après 6 jours d'exposition.

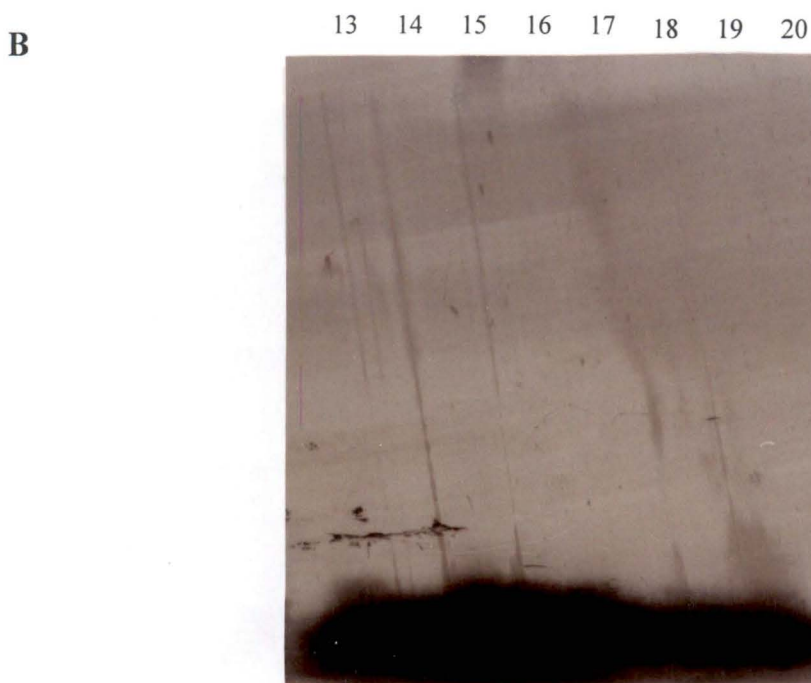
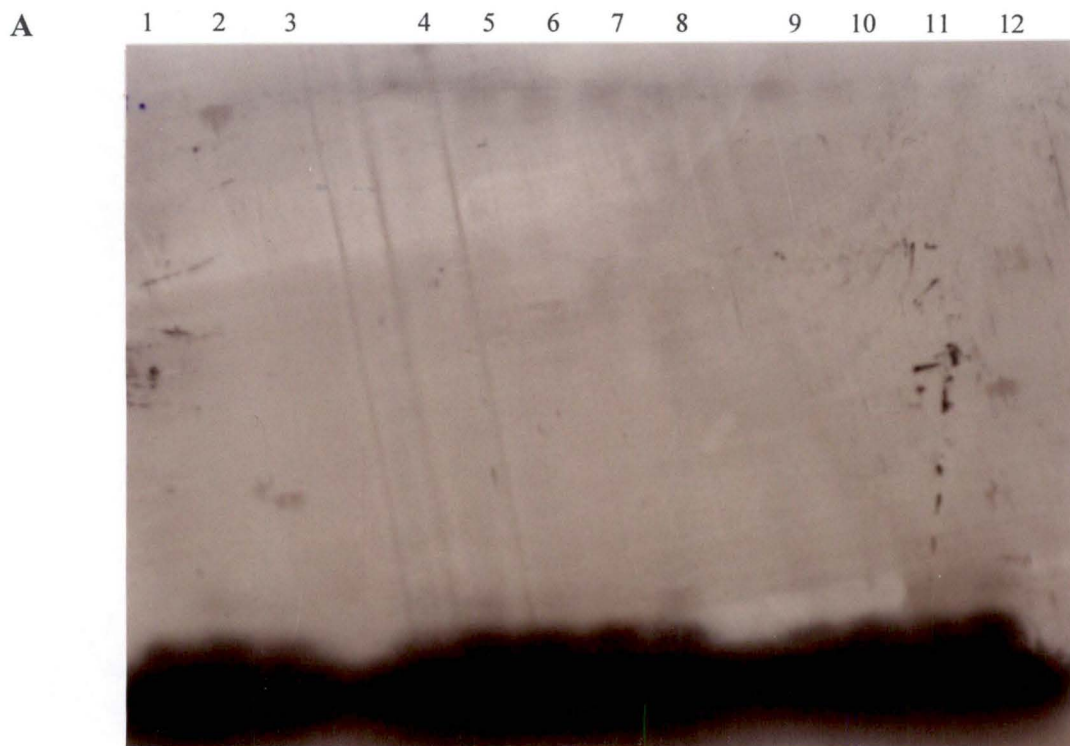
### **5.4.1 Effet sur la phosphorylation de la forskoline, du dibutyryl-AMPC et des oligopectates (*figures 41 A, B et 42 A*)**

La forskoline, le dibutyryl-AMPC et les oligopectates n'induisent aucune phosphorylation sur des protéines de haut poids moléculaire. Par contre, une bande correspondant à une protéine phosphorylée de faible poids moléculaire (partiellement masquée par le front de migration) est détectée pour chacun des traitements, ainsi que pour le témoin non traité.

La superposition de ces autoradiographies et des western blot, ne permet donc pas de mettre en évidence une phosphorylation du facteur CREB après un traitement de 1 à 13 minutes à la forskoline, de 1 à 15 minutes au dibutyryl-AMPC et de 0,5 à 4 heures aux oligopectates.

### **5.4.2 Effet de l'acide salicylique sur la phosphorylation (*figure 42 B*)**





**Figure 41 : Effet du dibutyryl-AMPc et de la forskoline sur la phosphorylation.**

Des cellules BY-2 sont incubées avec du phosphate radioactif puis traitées avec 100  $\mu$ M de dibutyryl-AMPc (A) ou 100  $\mu$ M de forskoline (B). Après migration sur gel SDS-PAGE, le gel a été exposé 6 jours avec un film autoradiographique. Les dépôts de 2 à 12 correspondent respectivement à 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13 et 15 minutes de traitement au dibutyryl-AMPc. Les dépôts de 14 à 20 correspondent respectivement à 1, 2, 7, 8, 9 et 11 minutes de traitement à la forskoline. Les dépôts 1 et 13 sont des témoins non traités.

**A****B**

**Figure 42 : Effet des oligopectates et de l'acide salicylique sur la phosphorylation de CREB .**

Des cellules de tabac BY-2 ont été incubées avec du phosphate marqué puis traitées avec 0.2 mg/ml d'oligopectates (A) ou 250  $\mu$ M d'acide salicylique (B). Après migration sur gel SDS-PAGE, le gel a été exposé 6 jours avec un film autoradiographique. Les dépôts de 2 à 5 correspondent respectivement à 0.5, 1, 2 et 4 heures de traitement aux oligopectates. Les dépôts de 7 à 10 correspondent respectivement à 5, 10, 15 et 20 minutes de traitement à l'acide salicylique. Les dépôts 1 et 6 sont des témoins non traités.

L'acide salicylique induit après 5 minutes la phosphorylation d'au moins 5 protéines. Aucun signal n'est détecté après 5 minutes de traitement.

La comparaison de l'autoradiographie avec le western blot correspondant permet de faire coïncider la bande inférieure révélée par western blot avec l'un des spots correspondant à une protéine phosphorylée après 5 minutes de traitement à l'acide salicylique.

On peut donc conclure qu'une protéine reconnue par l'anticorps anti-CREB-A est probablement phosphorylée en présence d'acide salicylique à une concentration finale de 250  $\mu\text{M}$ .



## DISCUSSION GENERALE

Les objectifs de ce mémoire étaient d'étudier le mode d'activation du facteur de transcription CREB qui, chez les cellules animales, est activé par phosphorylation via la protéine kinase A. Bien que plusieurs protéines CREB-like aient été identifiées chez les plantes, il n'a pas encore été démontré clairement qu'il existait un lien entre la production d'AMPC, CREB et une réponse physiologique de la plante.

Dans ce mémoire, nous avons démontré, de manière indirecte, qu'il était possible d'établir un lien entre l'AMPC et CREB au niveau transcriptionnel. En effet, le dibutyryl-AMPC et la forskoline sont capables d'induire une augmentation du taux de transcription du gène CREB endéans les 20 minutes suivant l'ajout de ces substances aux cellules de tabac BY-2 cultivées en suspension. Cette activation transcriptionnelle du gène CREB n'avait, jusqu'à présent, pas été rapportée dans la littérature « végétale ». Ce qui est plus surprenant, c'est que ces mêmes modulateurs de la voie de l'AMPC n'affectent en rien le taux de phosphorylation de la protéine CREB comme c'est le cas chez les cellules animales. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ces observations :

- La protéine CREB n'est pas phosphorylée de manière AMPC-dépendante. Seule l'activation du gène CREB serait AMPC-dépendante.
- La « fenêtre temporelle » d'analyse de la phosphorylation de CREB n'est pas adéquate. Cette hypothèse sous-entend que la protéine CREB serait absente des cellules non stimulées et n'apparaîtrait qu'après transcription du gène correspondant.

Des impératifs de temps ne nous ont pas permis de tester ces hypothèses.

En ce qui concerne les effets de l'acide salicylique, nous avons démontré que ce messager secondaire typiquement végétal est capable d'induire, à la fois, une transcription du gène CREB et une phosphorylation de la protéine CREB. Ces deux réponses cellulaires sont très rapides (5-10 minutes), ce qui permet d'avancer que la protéine CREB est présente dans les cellules sous une forme non-phosphorylée (inactive ?) dans les cellules avant la stimulation (ce qui élimine partiellement l'hypothèse 2 avancée plus haut). Dans ce cas, l'acide salicylique stimulerait une sorte de boucle d'activation positive assurant une accumulation d'un plus grand nombre de facteurs de transcription CREB dans la cellule.

Il est cependant encore trop prématuré pour donner une signification physiologique à l'effet de l'acide salicylique sur CREB puisque cet effet n'a jamais été rapporté dans la littérature. Des communications entre voies de transduction du signal sont cependant monnaie courante aussi bien chez les cellules animales que végétales. Pour rappel, l'adénylate cyclase, les phosphodiesterases, les protéines kinases A et CREB lui-même peuvent être modulées via le calcium ou la voie des phosphoinositides. La présence de nombreuses isoformes pour chacun des intermédiaires de la voie permet, en effet, de moduler de manière très précise les réponses de la cellule dans un environnement changeant.

Pour revenir à l'acide salicylique, il est utile de rappeler ici que ce composé phénolique se trouve au centre d'un réseau de communication intracellulaire chez la plante en situation de stress. Il contrôle, en effet, la réponse hypersensible (choc oxydatif) et l'étendue de celle-ci dans la plante ; il est un messager secondaire agissant à distance et médiant la « vaccination » de la plante contre divers agents pathogènes. Pour ce faire, l'acide salicylique contrôle :

- La voie du méthyljasmonate : Il inhibe la production de méthyljasmonate, un messager secondaire volatile induisant l'activation d'un grand nombre de gènes de défense et participant, directement ou indirectement, à l'élaboration d'une réponse de défense systémique.

- La production de peroxyde d'hydrogène : Il inhibe les enzymes de détoxification du peroxyde d'hydrogène à l'endroit où un pathogène infecte la plante. Ce faisant, l'acide salicylique favorise et renforce l'accumulation de peroxyde d'hydrogène. Ce choc oxydatif est indispensable à l'élimination de l'agent pathogène.
- L'apoptose : L'acide salicylique fait partie des messagers secondaires qui sont indispensables au déclenchement de la mort cellulaire programmée.
- La synthèse de protéines PR : L'acide salicylique induit directement la transcription d'une série de gènes codant pour des protéines de défense. Ces gènes possèdent, en effet, une séquence Acide salicylique-dépendante dans leur promoteur.
- La synthèse de phytoalexines : L'acide salicylique induit, en collaboration avec le peroxyde d'hydrogène, la synthèse et l'accumulation de phytoalexines, des antibiotiques végétaux.

Vue cette position stratégique de l'acide salicylique dans la communication intracellulaire, il ne serait pas étonnant de se voir confirmer, dans un avenir relativement proche, le lien avec la voie de l'AMPc que nous avons mis en évidence dans ce travail.

Une manière relativement aisée de vérifier, par exemple, l'effet de l'acide salicylique sur la transcription du gène CREB serait d'analyser le promoteur de ce gène et de confirmer la présence de séquence (CTGACGTAAGGGATGACGCAC) répondant à l'acide salicylique. Une alternative à cette approche génétique serait de recommencer les expériences de ce mémoire sur des cellules de tabac transformées avec le gène de la salicylate hydroxylase (NahG), une enzyme qui transforme l'acide salicylique en catéchol inactif. Dans de telles cellules, l'application d'acide salicylique exogène ne devrait induire ni activation transcriptionnelle du gène CREB, ni la phosphorylation de la protéine correspondante.



En ce qui concerne les cellules traitées avec des oligopectates, nous ne pouvons pas tirer de conclusions valables quant à leur effet sur la transcription du gène CREB ou sur la phosphorylation de la protéine CREB. Différents paramètres expérimentaux doivent d'abord être mieux maîtrisés dans ce cas particulier. Par exemple, un échantillonnage plus complet des cellules durant la période de traitement aux oligopectates permettrait probablement de mieux cerner un éventuel effet. De même, une meilleure connaissance de la sensibilité des cellules de tabac BY-2 aux oligopectates s'avère nécessaire afin de stimuler les cellules au bon moment pendant un temps suffisamment long.

Dans le cas où l'amélioration des protocoles mettraient en évidence un effet des oligopectates sur CREB, il serait ainsi possible d'ajouter la voie de l'AMPc à la liste des voies déjà activées par les oligopectates, à savoir la mobilisation de calcium IP3 indépendante, l'activation de la voie des phosphoinositides et du méthyljasmonate.

Si nous examinons l'ensemble des résultats obtenus, il convient cependant d'être prudent. En effet, les modulateurs que nous avons utilisés sont généralement bien caractérisés par leurs effets sur... des cellules animales. Il est bien connu que de tels modulateurs n'ont pas toujours les effets attendus lorsqu'ils sont utilisés dans un autre contexte. Il sera donc nécessaire de répéter les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire avec d'autres modulateurs ayant les mêmes cibles que la forskoline et le dibutyryl-AMPc. Ce n'est que dans une telle optique qu'il sera possible d'affirmer qu'il y a effectivement un lien entre l'AMPc et CREB. De même, la combinaison de modulateurs de la voie de l'AMPc et de traitement à l'acide salicylique permettra probablement de cerner à quel niveau de la voie de l'AMPc l'acide salicylique exerce son effet modulateur, voire activateur, de CREB.

## BIBLIOGRAPHIE

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

**Assmann S. M.** (1995) Cyclic AMP as a Second Messenger in Higher Plants. *Plant Physiol.* 108 885-889 .

**Barritt G. J.** (1994) Communication within animal cells. *Oxford science publications.*

**Belvin M. P., Zhou H., and Yin J. C.** (1999) The Drosophila dCREB2 gene affects the circadian clock. *Neuron* 22 (4): 777-787.

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

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

**Bolker M.** (1998) Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol* 25(3): 143-156.

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

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

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

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

**Choi E.-J., Xia Z., Villacres E. C., and Storm D. R.** (1993) The regulatory diversity of the mammalian adenynyl cyclases. *Current biology* 5: 269-273.

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

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

**Droillard M. J., Güclü J., Le Caer J. P., Mathieu Y., Guern J., and Laurière C.** (1997) Identification of calreticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. *Planta* 202: 341-348.

**Ehsan H., Reichheld J. P., Roef L., Witters E., Lardon F., Van Bockstaele D., Van Montagu M., Inze D., and Van Onckelen H.** (1998) Effect of indomethacin on cell cycle dependent cyclic AMP fluxes in tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett.* 422 (2): 165-169.

**Felinski E. A. and Quinn P. G.** (1999) The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein-associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding. *J Biol Chem.* 274 (17): 11672-11678.

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

**Fiol C. J. WJS, Chou C., Wang Q. M., Roach P. J., Andrisani O. M.** (1994) A second phosphorylation of CREB-At ser required for the cAMP-mediated control of gene expression. *J. Biol. Chem.* 269 32187-32193 .

**Gabriel S. E., Davenport S. E., Steagall R. J., Vimal V., Carlson T., and Rozhon E. J.** (1999) A novel plant-derived inhibitor of cAMP-mediated fluid and chloride secretion. *Am J Physiol* 276: G58-63.

**Gancedo J. M., Mazon M. J., and Eraso P.** (1985) Biological roles of cAMP: similarities and differences between organisms. *TIBS* 10: 47-49.

**Hayashida N. MT, S. K.** (1993) Cloning and characterisation of a plant gene encoding a protein kinase gene. *Gene.* 124 251-255 .

**Hibert M.F. HJ** (1993) Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G. *m/s* 9 31-40 .

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

**Hooley R.** (1998) Plant hormone perception and action: a role G-protein signal transduction? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353 (1374): 1425-1430.

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

**Hurley J. H.** (1998) The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 8(6): 770-777.



**Ichikawa T., Suzuki Y., Czaja I., Schommer C., Lessnick A., Schell J., and Walden R.** (1997) Identification and role of adenynyl cyclase in auxin signalling in higher plants. *Nature* 390 (6661): 698-701.

**Impey S., Smith D. M., Obrietan K., Donahue R., Wade C., and Storm D. R.** (1998) Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* 1 (7): 595-601.

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

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

**Kawai M., Aotsuka S., and Uchimiya H.** (1998) Isolation of a cotton CAP gene : a homologue of adenynyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation. *Plant Cell Physiol.* 39 (12): 1380-1383 .

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

**Klessig D. F. and Malamy J.** (1994) The salicylic acid signal in plants. 26: 1439-1458.

**Lapko V. N., Wells T. A., and Song P. S.** (1996) Protein kinase A-catalyzed phosphorylation and its effect on conformation in phytochrome A. 35 (21): 6585-6594.

**Urosaki F. and Nishi A.** (1993) Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells. *Arch Biochem Biophys* 302(1): 144-51.

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

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

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

**Lee M. M., Badache A., and DeVries G. H.** (1999) Phosphorylation of CREB in axon-induced Schwann cell proliferation. *J Neurosci Res* 55 (6): 702-712.

**Levine R. A., Nandi J., and King R. L.** (1990) Aspirin potentiates prestimulated acid secretion and mobilizes intracellular calcium in rabbit parietal cell. *J Clin Invest* 86 (2): 400-408.

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

**Li W, Luan S, Schreiber SL, Assman SM.** (1994) Cyclic AMP stimulates K<sup>+</sup> channel activity in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant physiol.* 106: 957-961.

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

**Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell** (1997) Biologie moléculaire de la cellule. *De Boeck, University.*

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

**MacKintosh C. and MacKintosh R. W.** (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *TIBS* 19: 444-447.

**Martelli P., Lusini P., Bovalini L., Bartali R., Franchi G. G., and Cinci G.** (1987) Occurrence of cyclic AMP and related enzymes during germination of *Pinus pinea* seeds. *Ital J Biochem* 36(3): 188-193.

**Maurel C., Kado R. T., Guern J., and Chrispeels M. J.** (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. *EMBO J* 14(13): 3028-3035.

**McKnight G. S., Clegg C. H., Uhler M. D., Chrivia J. C., Cadd G. G., Correll L. A., Otten A. D.** (1988) Analysis of the cAMP-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. *Recent progress in hormone research* 44: 207-335.

**Messiaen J. and van Cutsem P.** (1994) Pectin signal transduction in carrot cells: membrana, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. 35 (4): 677-689.

**Montminy M. R. and Bilezikjian L. M.** (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328 (9): 175-178.

**Mulligan R. M., Chory J., and Ecker J. R.** (1997) Signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (7): 2793-2795.



**Munoz J. A., Coronado C., Perez-Hormaeche J., Kondorosi A., Ratet P., and Palomares A. J.** (1998) MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-Rhizobium meliloti interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (16): 9687-9692.

**Nagata T., Nemoto Y., and Hasezawa S.** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *International review of cytology* :1-30.

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

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

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

**Parker D., Ferreri K., Nakajima T., LaMorte V. J., Evans R., Koerber S. C., Hoeger S. C., and Montminy M. R.** (1996) Phosphorylation of CREB-At Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16 (2): 694-703.

**Plakidou-Dymock S., Dymock D., and Hooley R.** (1998) A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol.* 8 (6): 315-324.

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

**Reverchon S., Expert D., Robert-Baudouy J., and Nasser W.** (1997) The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *erwinia chrysanthemis*. *J Bacteriol.* 179 (11): 3500-3508.

**Schlich K. MJ, Poppleton HM., Pierre SC., Lindorfer MA., Garrison JC., Patel TB.** (1999) Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. *Science* 283 (5406): 1328-1331.

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

**Simonds W. F.** (1999) G protein regulation of adenylyl cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 20(2): 66-73.

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



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

**Sunahara R. K., Dessauer C. W., and Gilman A. G.** (1996) Complexity and diversity of mammalian adenynyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 461-480.

**Suzuki D. T. GA, Miller J. H., Lewontin R. C.** (1991) Introduction à l'analyse génétique. *De Boeck, Bruxelles*.  
- *Physiol* 108: 451-457.

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

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

**Van Cutsem P. and Messiaen J.** (1995) Biological effects of pectic fragments in plant cells. *Acta Bot.Neerl.* 43 (3): 1140-1150 .

**van de Loo F. J. TS, Sommerville C.** (1995) Expressed sequence tags from developing castor seeds. *Plant Physiol.* :231-245.

**Viard M. P., Martin F., Pugin A., Ricci P., and Blein J. P.** (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 104: 1245-1249.

**Wolfl S., Martinez C., and Majzoub J. A.** (1999) Inducible binding of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-responsive element binding protein (CREB) to a cAMP-responsive promoter in vivo. *Mol Endocrinol.* 13 (5): 659-669.

**Wurgler-Murphy S. M. and Saito H.** (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *TIBS* 22: 172-176.

**Zhang B. and Klessig D. F.** (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9 (5): 809-824.

**Zunkler B. J., Trube G., and Ohno-Shosaku T.** (1988) Forskolin-induced block of delayed rectifying K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells in not mediated by cAMP. *Pflugers Arch* 411(6): 613-619.