

2m11.3456.9

Université de Montréal

**Génération et caractérisation de racines transgéniques
de pomme de terre *Solanum tuberosum* avec des niveaux
altérés de pyruvate kinase cytosolique**

Par
Stéphanie Buisson

Département de Sciences Biologiques
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)
en Sciences Biologiques

Août, 2006

© Stéphanie Buisson, 2006



QK

3

U54

2006

V. 009

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé

**Génération et caractérisation de racines transgéniques
de pomme de terre *Solanum tuberosum* avec des niveaux
altérés de pyruvate kinase cytosolique**

Présenté par

Stéphanie Buisson

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. David Morse (IRBV), Président-rapporteur

Dr. Jean Rivoal (IRBV), Directeur de recherche

Dr. Mario Jolicoeur (Ecole polytechnique,
département de génie chimique), Membre du jury

Résumé

Mon projet de maîtrise portait sur la modification de l'expression de la dernière enzyme de la glycolyse végétale, la pyruvate kinase cytosolique (PKc). La PKc produit du pyruvate et de l'adénosine triphosphate à partir de phosphoenolpyruvate et d'adénosine diphosphate. D'après des études de caractérisation *in vitro*, cette enzyme est considérée comme une enzyme clé de la régulation glycolytique et jouerait un rôle central dans le contrôle du flux glycolytique.

Nous avons généré une population de clones racinaires de pomme de terre portant des constructions sens et antisens pour la pKc. Des analyses d'activité enzymatiques et des immunobuvardages nous ont permis d'identifier des clones antisens ayant des niveaux réduits de PKc. Nous n'avons pas réussi à générer des clones surexprimant la PKc. Une caractérisation préliminaire a permis de montrer qu'une diminution de l'expression de la PKc avait un effet négatif sur la croissance des racines.

Mots clés

Pyruvate kinase cytosolique, glycolyse, régulation, *Solanum tuberosum*, racines, transgénèse.

Abstract

My master's project concerns the modification of cytosolic pyruvate kinase (PKc) expression, the last enzyme in the plant glycolytic pathway. PKc produces pyruvate and adenosine triphosphate from phosphoenolpyruvate and adenosine diphosphate. *In vitro* characterization studies showed that PKc is a key enzyme in the regulation of the glycolysis and should have an important role in the glycolytic flux control.

We generated a population of potato root clones with PKc sense and antisense constructs. We found antisense clones with reduced levels of PKc as measured by enzymatic activities and immunoblots. We were not successful in generating over-expressing PKc clones. A preliminary characterization demonstrated that the decrease of PKc expression has a negative effect on root growth.

Key words

Cytosolic pyruvate kinase, glycolysis, regulation, *Solanum tuberosum*, roots, transgenesis

Table des matières

Page de titre	i
Identification du jury	ii
Résumé et mots clés	iii
Abstract and key words	iv
Table des matières	v
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des sigles et des abréviations	xiv
Remerciements	xviii
I- Introduction	1
II- Revue de littérature	4
1- La glycolyse, son organisation et son rôle comme voie centrale du métabolisme	4
2- Implication de la glycolyse végétale dans la résistance aux stress environnementaux	10
3- La régulation de la glycolyse	16
4- L'analyse du contrôle métabolique	20
5- La pyruvate kinase	22

III- Matériel et Méthodes	29
1- Matériel biologique	29
1. Matériel végétal	29
2. Bactérie <i>Escherichia coli</i>	29
3. Bactérie <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30
2- Produits chimiques	30
3- Vecteur de clonage	30
4- ADN complémentaire de la PK	31
5- Constructions pour la transformation des tiges de pomme de terre et réactions de ligation dans le vecteur d'expression binaire pGA643	35
1. En orientation sens	35
2. En orientation antisens	37
3. Construction contrôle	37
4. Réactions de ligation	37
6- Transformation de bactéries compétentes <i>Escherichia coli</i> HB 101	39
7- Purification d'ADN plasmidique à partir de culture bactérienne <i>E. coli</i> HB 101	40

8- Préparation et transformation directe de bactéries compétentes <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	41
9- Purification d'ADN plasmidique à partir de culture bactérienne <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	43
10- Analyses de restrictions	44
11- Transformation de tiges de pomme de terre par <i>A. rhizogenes</i>	45
12- Sous-culture des clones racinaires	46
13- Extraction totale de protéines et quantification	48
14- Mesures enzymatiques <i>in vitro</i>	49
1. Pyruvate kinase (PK)	49
2. Phosphoénolpyruvate phosphatase (PEPase)	50
3. Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC)	50
4. Pyruvate décarboxylase (PDC)	52
5. Phosphofructokinase-ATP dépendante (PFK)	53
6. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)	54
7. Phosphofructokinase-pyrophosphate inorganique (Pi) dépendante (PFK)	54
8. Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase- NAD(P) dépendante (NAD(P)-GAPDH)	55

9. Triose phosphate isomérase (TPI)	55
10. Aldolase (ALD)	56
11. Alcool déshydrogénase (ADH)	56
12. Alanine aminotransférase (AAT)	56
13. Malate déshydrogénase-NAD(P) dépendante (NAD(P)-MDH)	57
14. Isocitrate déshydrogénase-NAD(P) dépendante (NAD(P)-ICDH)	57
15. Lactate déshydrogénase (LDH)	58
16. Glucokinase (GK) et Fructokinase (FK)	58
15- Analyse de protéines de type western-blot	58
16- Visualisation d'activité enzymatique par coloration sur gel natif de polyacrylamide	60
17- Mesures de croissance	61
IV- Résultats	62
1- ADN complémentaire de la PK	62
2- Constructions pour la transformation des pétioles de pomme de terre avec <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	62
1. Constructions en orientation sens	62

2. Constructions en orientation antisens	63
3. Construction contrôle	65
3- Transformations de pétioles de pomme de terre avec <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	65
4- Criblage des clones racinaires générés après transformation	65
1. Mesures de l'activité enzymatique totale de la pyruvate kinase dans des extraits totaux de protéines	66
2. Étude de la dégradation protéolytique de la protéine pyruvate kinase	68
3. Etude de stabilité des activités PK et PEPase en fonction du temps	69
4. Activité pyruvate kinase sur gel natif	71
5. Visualisation de la quantité de protéines PKc par analyse de type western-blot	74
5- Caractérisation de l'activité des enzymes glycolytiques chez les lignées transgéniques	79
6- Mesures de croissance	84

V- Discussion	87
1- La stratégie utilisée permet la sous-expression mais pas la sur-expression de la PKc	88
2- La PKc apparaît susceptible à la dégradation protéolytique dans les racines de pomme de terre	92
3- Caractérisation préliminaire des racines transgéniques	96
VI- Conclusion	102
VII- Références bibliographiques	104

Liste des figures

II- Revue de littérature

Figure II-1	5
Figure II-2	6
Figure II-3	14

III- Matériel et Méthodes

Figure III-1	32-34
Figure III-2	36
Figure III-3	38
Figure III-4	47
Figure III-5	51

IV- Résultats

Figure IV-1	67
Figure IV-2	70
Figure IV-3	72
Figure IV-4	73
Figure IV-5	75

Figure IV-6	76
Figure IV-7	78
Figure IV-8	80
Figure IV-9	81
Figure IV-10	85
Figure IV-11	86

Liste des tableaux

IV- Résultats

Tableau IV-1	64
Tableau IV-2	82
Tableau IV-3	83

Liste des sigles et des abréviations

µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire
µmol	micromole
%	pour cent
°C	degrés Celsius
2-PGA	2-phosphoglycerate
3'	extrémité 3' sur un acide nucléique
3-PGA	3-phosphoglycerate
5'	extrémité 5' sur un acide nucléique
<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
AAT	alanine aminotransférase
AAT	aspartate aminotransférase
ADN	acide désoxyribonucléotide
ADNc	acide désoxyribonucléotide complémentaire
ADH	alcool déshydrogénase
ADP	adénosine diphosphate
ALD	aldolase
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
AS	antisens
ATP	adénosine triphosphate
ATP-PFK	phosphofructokinase dépendante d'adénosine triphosphate
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
<i>BamHI</i>	endonucléase de restriction
BCIP	bromochlorylindolophosphate
<i>BglII</i>	endonucléase de restriction
BSA	sérum albumine bovine
C	carboxyle
CaCl ₂	dichlorure de calcium
CAM	Crassulacean acid metabolism
CH ₃ COOK	acétate de potassium
Cl	contrôle
cm	centimètre
CO ₂	dioxyde de carbone
CoA	coenzyme A
Da	dalton
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	endonucléase de restriction
<i>EcoRV</i>	endonucléase de restriction
EDTA	acide éthylène-diamine-tétracétique

EGTA	acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraacétique
f	fonction
FBPase	fructose-1,6-bisphosphatase
FCC	coefficient de contrôle de flux
FK	fructokinase
Fru-1,6-P2	fructose 1,6-diphosphate
Fructose 6-P	fructose 6-phosphate
fmole	femtomole
g	gramme
G3P	glyceraldéhyde-3-phosphate
G3PDH	glycérol 3-phosphate déshydrogénase
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAP	glyceraldéhyde 3-phosphate
GAPDH	glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GK	glucokinase
Glucose 1-P	glucose 1-phosphate
Glucose 6-P	glucose 6-phosphate
GOGAT	glutamine α -cétoglutarate aminotransférase
GS	glutamine synthétase
h	heure
H ⁺	protons
H ₂ O	eau
HCO ₃ ⁻	ion bicarbonate
HCOOH	acide formique
HCl	chlorure d'hydrogène
Hepes	acide 4-(2-Hydroxyéthyl)piperazine-1-ethanesulfonique
HK	hexokinase
ICDH	isocitrate déshydrogénase
Ig	Immunoglobuline
K ⁺	ion potassium
kb	kilobase
KCl	chlorure de potassium
kDa	kilodalton
KHCO ₃	bicarbonate de potassium
kJ	kilojoule
KOH	hydroxyde de potassium
<i>KpnI</i>	endonucléase de restriction
l	litre
LB	Luria-Bertani
LDH	lactate déshydrogénase
M	molaire
Mes	acide 4-morpholine-ethanesulfonique
Mg ²⁺	ion magnésium
mg	milligramme
MgCl ₂	dichlorure de magnésium
MCA	metabolic control analysis, analyse du contrôle métabolique

MDH	malate déshydrogénase
ME	enzyme malique
min	minute
ml	millilitre
mol	mole
mM	millimolaire
MM	marqueurs moléculaires
MS	Murashige/Skoog
MYA	mannitol, yeast, ammonium
N	amirto
NaCl	chlorure de sodium
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaOH	hydroxyde de sodium
NaPPi	pyrophosphate inorganique de sodium
NBT	nitrobleu de tetrazolium
NH ₄ ⁺	ions ammonium
NIP	protéine inhibitrice de la nitrate réductase
nkat	nanokatal
nm	nanomètre
N/P/K	nitrogen/phosphorus/potassium
NR	nitrate réductase
NR-P	nitrate réductase phosphorylée
OAA	oxaloacétate
p/v	poids/volume
P	phosphate
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	paire de base
PCI	phénol, chloroforme, isoamyl-alcool
PDC	pyruvate décarboxylase
PEG	polyéthylène glycol
PEP	phospho <i>enol</i> pyruvate
PEPase	phospho <i>enol</i> pyruvate phosphatase
PEPC	phospho <i>enol</i> pyruvate carboxylase
PFK	phosphofructokinase-adénosine triphosphate dépendante
PFP	phosphofructokinase-pyrophosphate inorganique dépendante
PGA Kinase	phosphoglycérate kinase
PGI	phosphoglucose isomérase
PGK	3-phosphoglycerate kinase
PGM	phosphoglycérmutase
Pi	phosphate inorganique
PIPES	acide 1,4-piperazinediethanesulfonique
PK	pyruvate kinase
PKc	pyruvate kinase, isoforme cytosolique
PKp	pyruvate kinase, isoforme plastidique

PMSF	phényl méthyl sulfonyl fluoride
PPi	pyrophosphate inorganique
PPi-PFK, PFP	phosphofruktokinase dépendante de pyrophosphate
Prot	protéine
<i>PsiI</i>	endonucléase de restriction
PVDF	polyvinylidene fluoride
PVP	polyvinylpyrrolidone
rpm	rotation par minute
S	substrat
S	sens
SDS	sodium dodécyl sulfate
Ser	sérine
<i>SmaI</i>	endonucléase de restriction
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TCA	acide trichloroacétique
TCM	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TK	transkétolase
TPI	triose phosphate isomérase
TPP	thiamine diphosphate
TPT	triose phosphate translocator
UDP	uracile diphosphate
UDPG	uridine diphosphoglucose
UTP	uracile triphosphate
U	unité
V	vitesse
V	volt
v/v	volume/volume

Remerciements

Je remercie Dr. Jean Rivoal pour son aide et sa supervision qu'il m'a apportées lors de l'écriture de ce mémoire de maîtrise.

Je remercie vivement les membres du jury, Dr. David Morse et Dr. Mario Jolicoeur pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire de maîtrise dans des délais extrêmement courts.

Je remercie également Dr. K. Cole et Dr. D. Dennis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, pour nous avoir généreusement fourni l'ADNc codant pour la pyruvate kinase, isoforme cytosolique de la pomme de terre *Solanum tuberosum*, qui nous a permis de réaliser ce projet.

Je remercie également Dr. W.C Plaxton, Queen's University, Ontario, Canada qui nous a généreusement donné l'anticorps polyclonal de lapin anti-*Brassica napus* PKc qui a été utilisé tout au long de ce projet.

Enfin je remercie Audrey Clendenning et Dr. Jean Rivoal pour avoir réalisé les expériences de croissance sur les clones racinaires.

I- Introduction

La respiration aérobie est le processus par lequel des composés organiques réduits sont mobilisés, puis oxydés de façon contrôlée. Pendant la respiration, une partie de l'énergie libre contenue dans le substrat carboné est incorporée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), qui peut être rapidement réquisitionnée pour la croissance et le développement de la plante. La glycolyse représente la première étape de la respiration des glucides. Les fonctions de cette voie du métabolisme primaire sont (1) de générer de l'ATP, du pyruvate et du pouvoir réducteur, en oxydant des hexoses, pour fournir les voies anaboliques de la cellule végétale, (2) de fournir des squelettes carbonés pour la biosynthèse de molécules comme les acides aminés et les acides gras et (3) d'alimenter également la respiration (voir section II-1). De plus, la glycolyse a un rôle dans les adaptations métaboliques en étant impliquée directement dans des stress environnementaux (anoxie, privation de phosphate) (voir section II-2).

Mon projet de maîtrise portait sur une enzyme de la voie glycolytique : la pyruvate kinase (PKc). Cette enzyme catalyse la dernière réaction de la voie en transférant un groupement phosphate du phosphoenolpyruvate (PEP) à une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) pour former du pyruvate et de l'ATP. Cette réaction est présente à la fois dans le plaste et le cytosol. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement, à l'isoforme cytosolique (PKc). D'après des études de caractérisation *in vitro*, cette enzyme est considérée comme une enzyme clé de la régulation glycolytique (Plaxton, 1996) et jouerait un rôle central dans le contrôle du flux glycolytique.

Mon sujet de maîtrise était la première étape d'un projet à longue échéance, qui porte sur l'implication de la PKc dans la régulation *in vivo* de la glycolyse en conditions normoxique et anoxique. Cette étude avait pour but de caractériser la PKc des végétaux par une approche de génie métabolique et de déterminer si la PKc est une enzyme contrôlant le flux glycolytique ou non. L'objectif de mon projet était de générer une population de clones racinaires de pomme de terre avec des niveaux altérés d'activité de PKc et d'en faire une caractérisation préliminaire. Cette population constituera l'outil sur lequel sera basée cette étude. En effet, cette dernière repose sur l'analyse du contrôle métabolique développée par Kacser (1973) qui consiste à utiliser une population de clones différant tous dans le niveau d'une enzyme. Cette altération peut être faite par des moyens transgéniques ou biochimiques. Elle permettra par exemple de savoir de combien le flux est modifié lorsqu'on modifie la quantité d'une enzyme et donc de connaître, dans le cas de ce projet, l'effet de la PKc sur le flux métabolique de la voie glycolytique. Cela permettra *a posteriori* de déterminer l'implication de la pyruvate kinase cytosolique dans la régulation *in vivo* de la glycolyse, dans la cellule végétale dans des conditions normales et de stress. De plus, il serait également intéressant d'étudier les effets sur la voie des Pentoses phosphates. Cette voie partage avec la glycolyse, le substrat glucose 6-phosphate. Les variations engendrées dans la glycolyse pourrait par conséquent avoir un effet sur le flux métabolique de la voie des Pentoses phosphates.

Pour réaliser ce projet, nous avons utilisé des racines de pomme de terre dans lesquelles nous avons inséré l'ADN complémentaire de la PK, isoforme cytosolique de pomme de terre *Solanum tuberosum*. Cet ADNc a été inséré de manière sens ou antisens pour, théoriquement, augmenter ou diminuer respectivement l'activité PKc. Par la suite,

les clones ont été sélectionnés et maintenus sur milieu nutritif. Une caractérisation préliminaire a été réalisée sur quelques clones choisis.

II- Revue de littérature

1- La glycolyse, son organisation et son rôle comme voie centrale du métabolisme

La glycolyse est la première partie de la voie métabolique des glucides dans la cellule animale et végétale. Elle a été étudiée de manière intensive chez les animaux, les micro-organismes et les plantes. La glycolyse est une voie généralement représentée de façon linéaire (constituée de 10 enzymes) qui catalyse la réaction nette suivante (figure II-1):



La glycolyse est une voie catabolique qui a pour rôles :

- d'oxyder des hexoses pour générer de l'énergie sous forme d'ATP, du pouvoir réducteur sous forme de NADH et du pyruvate
- de générer les squelettes carbonés pour fournir les voies anaboliques, telles que les synthèses des acides aminés, des acides gras et des acides nucléiques (figure II-2).

Cette voie est également une voie amphibolique car elle peut fonctionner en sens inverse pour générer des hexoses à partir de composés variés. On l'appelle dans ce cas, la gluconéogenèse. Cependant, chez les plantes, cette fonction est très restreinte car elle est limitée à une courte période dans la germination de certaines graines.

La glycolyse est également la voie qui fournit la respiration en carbone. Elle représente la première étape de ce processus qui est également constitué du cycle de Krebs et de la chaîne transporteur d'électrons qui se trouvent localisés dans la mitochondrie. La plus grande partie du carbone qui entre dans la glycolyse (puis dans le cycle de Krebs), n'est pas oxydé en CO₂ mais est utilisé dans la biosynthèse de

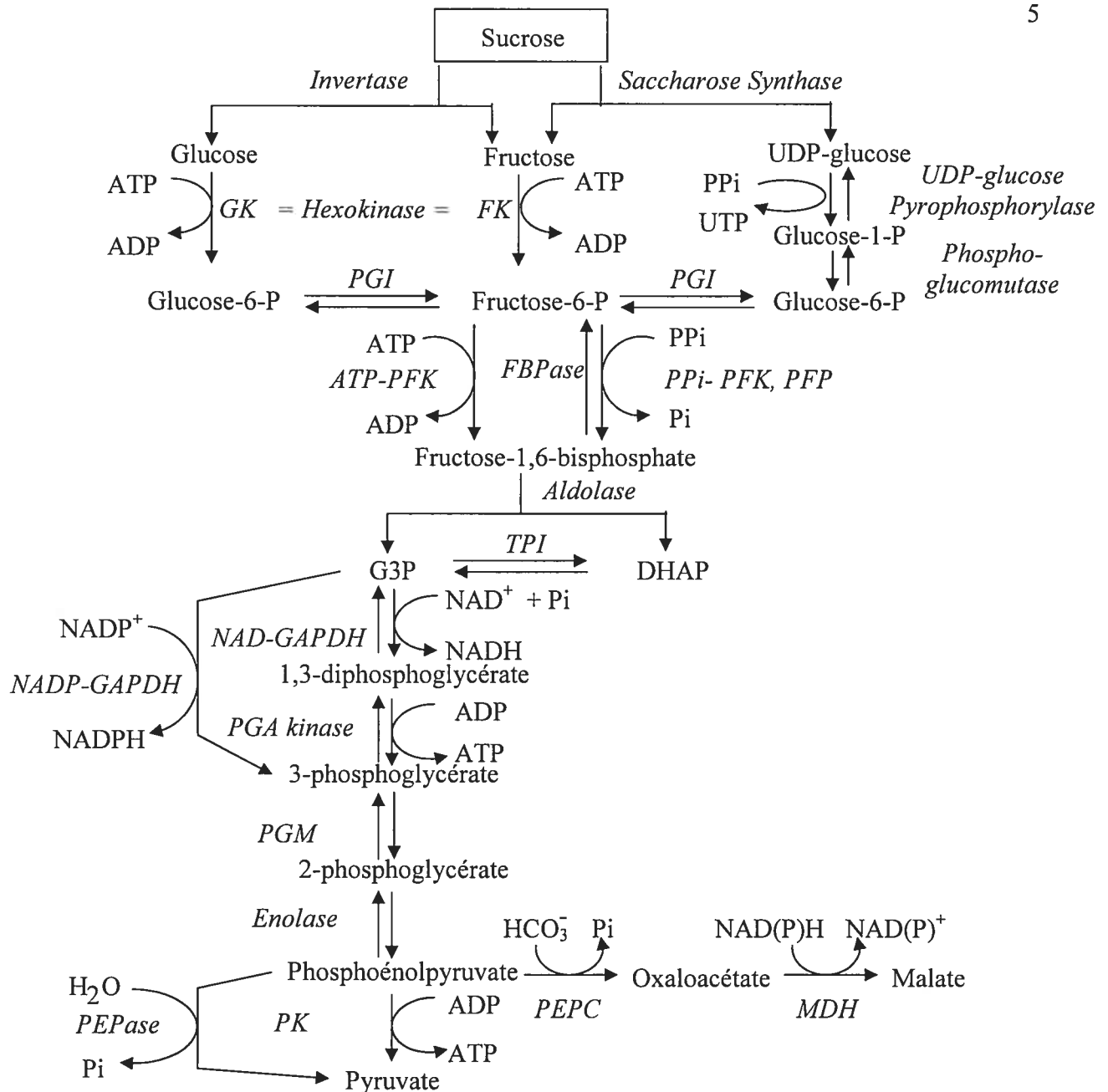


Figure II-1

Organisation de la voie glycolytique dans le cytosol. Les substrats et produits sont écrits en texte régulier et les enzymes sont en italiques.

Les abréviations sont les suivantes : (GK) glucokinase, (FK) fructokinase, (PGI) phosphoglucose isomérase, (ATP-PFK) phosphofructokinase dépendante d'ATP, (PPi-PFK, PFP) phosphofructokinase dépendante de pyrophosphate, (FBPase) fructose-1,6-bisphosphatase, (TPI) triose phosphate isomérase, (NAD(P)-GAPDH) glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dépendante de NAD(P), (PGA Kinase) phosphoglycérate kinase, (PGM) phosphoglycérémutase, (PK) pyruvate kinase, (PEPase) phosphoénolpyruvate phosphatase, (PEPC) phosphoénolpyruvate carboxylase, (MDH) malate déshydrogénase, (G3P) glyceraldéhyde-3-phosphate, (DHAP) dihydroxyacétone phosphate.

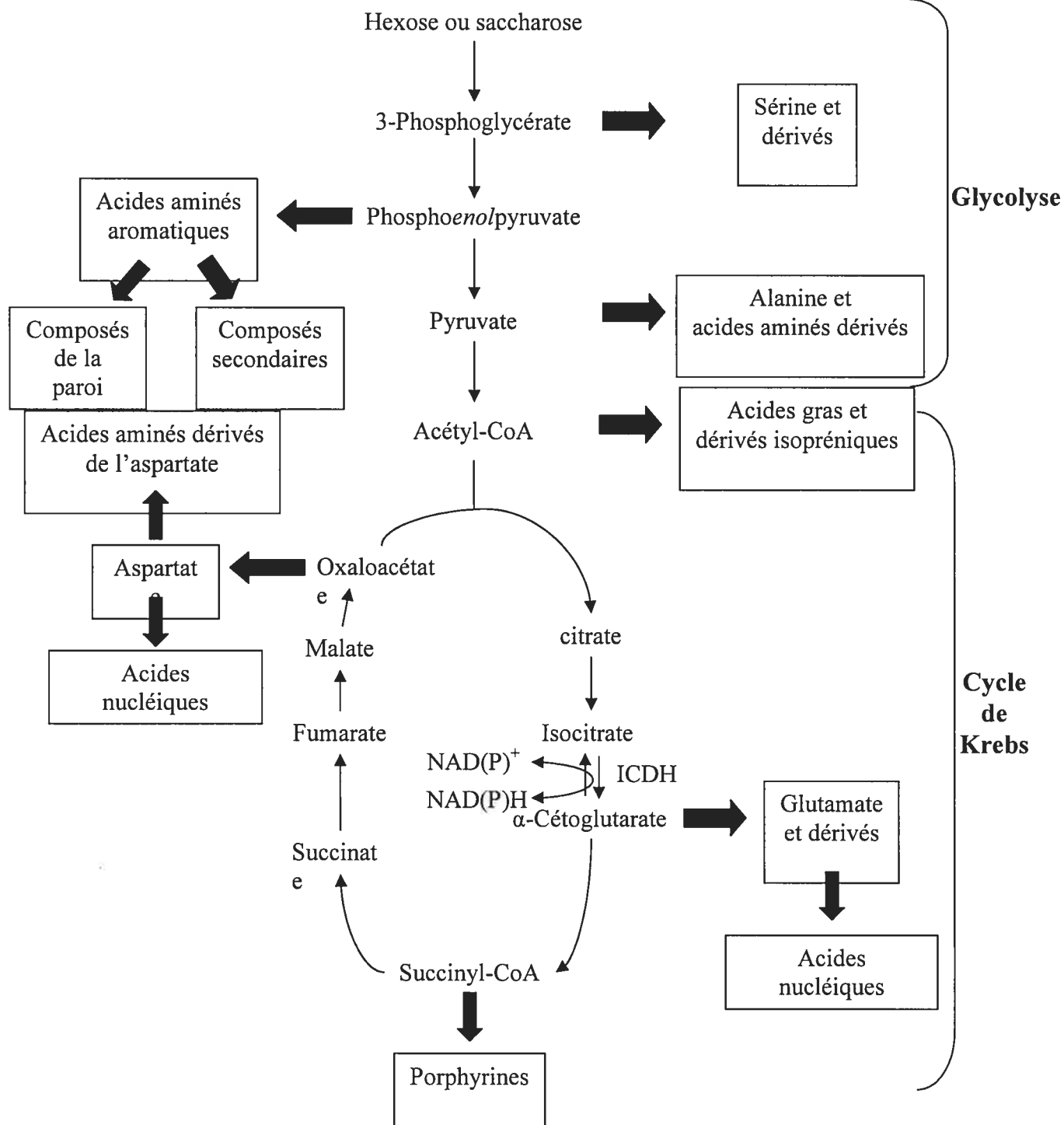


Figure II-2

Les intermédiaires produits au cours des réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs sont utilisés comme substrats pour fournir de nombreuses voies de biosynthèses végétales.

(ICDH) isocitrate déshydrogénase

nombreux composés. Le cycle de Krebs fournit entre autres des intermédiaires servant à la biosynthèse d'acides aminés (figure II-2). En effet, la glycolyse est considérée comme la voie métabolique centrale car elle a de multiples connexions. Les intermédiaires de la voie glycolytique servent de précurseurs aux voies anaboliques impliquées dans les synthèses des acides nucléiques, des acides gras, des acides aminés ou encore des constituants de la paroi cellulaire et des phénols dans la cellule végétale.

La glycolyse chez les animaux est présente dans tous les tissus. Cependant, chaque tissu utilise cette voie dans un but unique: le foie convertit préférentiellement le pyruvate en acides gras par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA, alors que le cerveau et les muscles vont métaboliser le glucose en lactate ou en CO_2 et H_2O pour la production d'énergie.

La glycolyse chez les plantes est plus complexe car elle est présente aussi bien dans le plaste que dans le cytosol et récemment il a été démontré qu'elle existait à la surface de la mitochondrie du côté cytosolique (Giegé *et al.*, 2003). Le plaste et le cytosol peuvent donc oxyder des hexoses en pyruvate par l'intermédiaire de leur propre voie. Les enzymes de la glycolyse se retrouvent par conséquent sous de multiples isoformes, spécifiques du compartiment dans lequel elles fonctionnent. Ces voies peuvent cependant communiquer de manière contrôlée par l'intermédiaire de transporteurs hautement spécifiques, phénomène connu entre les compartiments cytosoliques et plastidiques. Par exemple, on trouve un translocateur de triose phosphate (Triose Phosphate Translocator, TPT) spécifique des feuilles (Fliege *et al.*, 1978). Cet antiport est localisé dans la membrane interne du chloroplaste et échange par exemple le dihydroxyacetone phosphate (DHAP) contre du phosphate inorganique. Mais les échanges peuvent être différents suivant les espèces : pour les plantes en C4, ce même

transporteur peut également transporter du phosphoenolpyruvate (Gross *et al.*, 1990). Dans les tissus spécialisés comme le fruit en développement, les chloroplastes peuvent importer des hexoses phosphates en échange de phosphate inorganique (Schäfer *et al.*, 1977). Les plastes non photosynthétiques, comme les amyloplastes ou les leucoplastes peuvent également échanger une quantité plus variée de composés comme les 2- et 3-phosphoglycerate (2- et 3-PGA), le malate, le phosphoenolpyruvate, le glucose-6-phosphate, le glucose-1-phosphate, en plus des trioses phosphates (Borchert *et al.*, 1993, Hill *et al.*, 1991). Les échanges et le type de transporteurs présents dans un tissu dépendent de la fonction principale des plastes, c'est-à-dire principalement s'ils possèdent une fonction photosynthétique.

La diversité des échanges métaboliques entre les compartiments cytosolique et plastidique rendent donc la compréhension du métabolisme du carbone complexe. Ces échanges se font au niveau de 3 bassins de métabolites qui font partie de la voie glycolytique. Le premier pool, situé au début de la voie, est celui des hexoses phosphate constitué de glucose 6-phosphate, de fructose 6-phosphate et de glucose 1-phosphate, maintenu à l'équilibre par l'action des enzymes phosphoglucose isomerase (PGI) et phosphoglucomutase (PGM) (figure II-1). Ce pool représente le site principal d'entrée de carbone dans la voie. Les métabolites qui constituent ce pool sont formés par la dégradation des hexoses, du saccharose et/ou de l'amidon. Ils peuvent quitter le pool pour alimenter les synthèses d'amidon, de saccharose et des polysaccharides constituants de la paroi cellulaire (figure II-2). Ils alimentent également la voie oxydative des pentoses phosphates et évidemment la glycolyse. Le second pool est constitué par les trioses phosphate / pentoses phosphate composé des intermédiaires de la voie oxydative des pentoses phosphates qui sont à l'équilibre avec les 2 trioses phosphate de la

glycolyse, le glyceraldéhyde 3-phosphate (GAP) et le DHAP (figure II-1). Ces métabolites sont utilisés pour les synthèses d'acides gras (via le glycérol), des acides nucléiques, des acides aminés et acides aminés aromatiques, des lignines et des polyphénols (figure II-2). Ce pool fournit également la partie en aval de la glycolyse, et, dans les cellules photosynthétiques, fournit aussi la synthèse de saccharose qui est exporté vers les tissus non photosynthétiques. Le troisième pool est constitué des métabolites de la "partie basse de la glycolyse". Ce sont les intermédiaires des réactions enzymatiques produisant du pyruvate à partir du glyceraldéhyde 3-phosphate: le 3-phosphoglycerate (3-PGA), précurseur de la sérine; le PEP, précurseur des acides aminés aromatiques et des polyphénols et finalement, on trouve le pyruvate impliqué dans la synthèse d'acides aminés (alanine, valine et leucine), ainsi que dans la synthèse de l'éthanol et du lactate (figure II-2). Ce métabolite est également le précurseur de l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse des acides gras et au fonctionnement du cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs) (figure II-2).

Chez les plantes, la glycolyse cytosolique est branchée à l'aide d'une enzyme qui transforme le PEP en OAA, la PEPC. Cette enzyme fonctionne pour fixer le carbone atmosphérique et catalyse la première étape de la photosynthèse chez les plantes en C4 et CAM. Dans les tissus non chlorophylliens, la PEPC prend en charge jusqu'à 50% du flux glycolytique (Edwards *et al.*, 1998). L'OAA formé est transformé en malate par la MDH. Le malate et le pyruvate peuvent tous les 2 alimenter le cycle de Krebs.

Il existe donc de nombreux bassins de métabolites à l'intérieur même de la glycolyse. Ils sont tous en connexion les uns avec les autres et sont des précurseurs à de nombreuses voies de synthèse du métabolisme. Cet ensemble doit être extrêmement régulé afin d'avoir une coordination entre les synthèses et par conséquent, les besoins de

la cellule. De plus, comme il a été mentionné précédemment, le compartiment plastidique qui possède sa propre glycolyse, nécessite des interactions contrôlées entre les voies.

2- Implication de la glycolyse végétale dans la résistance aux stress environnementaux

Les plantes sont constamment soumises à différents stress environnementaux qui affectent leur croissance, leur développement et le bon fonctionnement de leur métabolisme. Dû au fait qu'elles ne peuvent se déplacer pour fuir ces effets perturbateurs, elles ont dû s'adapter et développer des mécanismes de défense qui leur confèrent une résistance face à ces perturbations extérieures. Ces dernières peuvent être d'origine soit biotique, soit abiotique.

Les stress d'origine biotiques sont dus à des attaques d'organismes tels que les bactéries, les virus, les champignons ou encore les herbivores alors que les stress abiotiques sont engendrés par des variations (excès ou déficit) dans l'environnement physique ou chimique de la plante. Ces changements sont variés et correspondent à des températures, à une exposition lumineuse trop fortes ou trop faibles, à un déséquilibre dans la composition du sol en minéraux, tels que le phosphate, le fer ou une trop forte teneur en sel ou encore aux inondations qui ont pour conséquence de limiter les plantes en apport d'oxygène.

Les plantes ont donc développé des mécanismes pour se protéger contre ses différents stress. Ils peuvent être de nature morphologique, physiologique ou encore métabolique. Dans ce dernier cas, des études ont démontré que le métabolisme primaire

était impliqué dans l'adaptation métabolique des plantes face à de nombreux stress (Theodorou et Plaxton, 1993 ; Plaxton, 1996). L'implication de la glycolyse dans les mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux a fait l'objet d'une revue récente (Rivoal *et al.*, 2004). Le fait que la glycolyse végétale soit organisée en réseau de réactions permet à certaines enzymes de prendre le relais d'autres enzymes sous certaines conditions. Ceci est le cas lors d'un appauvrissement de phosphate qui est probablement l'élément le plus limitant pour la croissance des plantes. Le phosphate inorganique joue un rôle vital dans le transfert d'énergie, dans la régulation métabolique et est également un constituant des macromolécules comme les phospholipides et les acides nucléiques. Lors d'une baisse d'apport de phosphate dans la cellule, cela entraîne une diminution du pool d'adénylates. Il y a alors induction d'enzymes capables de contourner les réactions utilisant de l'ATP ou de l'ADP (Duff *et al.*, 1989). Cette situation se retrouve à 3 niveaux dans la voie glycolytique : la phosphofructokinase dépendante du pyrophosphate produit du fructose 1,6-bisphosphate contournant ainsi la réaction catalysée par la phosphofructokinase dépendante d'ATP (Theodorou *et al.*, 1992 ; Duff *et al.*, 1989). La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dépendante de NADP (NADP-GAPDH), contourne les 2 réactions correspondant aux activités glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dépendante de NAD et la 3-phosphoglycérate kinase. La NADP-GAPDH produit directement du 3-phosphoglycérate, à partir du glyceraldéhyde 3-phosphate, sans utilisation de phosphate inorganique, ni d'ADP (Duff *et al.*, 1989). Puis au niveau du point de branchement du PEP, la PEP phosphatase permet également de contourner la réaction de la pyruvate kinase qui utilise de l'ADP (Duff *et al.*, 1989 ; 1991a.). La PEPase produit du pyruvate qui permet de continuer à fournir le cycle de Krebs, même dans les conditions où

l'apport en phosphate est limité. La privation en phosphate induit également la PEPC, aboutissant à la formation de malate (Duff *et al.*, 1989 ; Moraes *et al.*, 2000 ; Johnson *et al.*, 1996 ; Aono *et al.*, 2001). Par conséquent, la glycolyse démontre sa flexibilité métabolique en possédant d'une part, de multiples enzymes capables de catalyser une réaction spécifique et d'autre part, en utilisant des sources d'énergies alternatives comme le pyrophosphate.

Plusieurs enzymes glycolytiques sont régulées par la salinité. En effet, une étude a été réalisée sur des cultures de cellules de riz *Oryza sativa*, soumises à différents stress pendant 24 heures (Umeda *et al.*, 1994). Lors d'une augmentation en sel dans le milieu (2% chlorure de sodium), les expressions de gènes codant pour des enzymes glycolytiques ont été augmentées. C'est le cas des enzymes aldolase, triose phosphate isomérase, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NAD et 3-phosphoglycérate kinase qui ont vu leur expression doubler. Ces données suggèrent que les gènes impliqués pourraient partager un mécanisme de régulation commun. Par conséquent, même en conditions de stress, la glycolyse est capable de coordonner l'expression de certains gènes pour activer une série de réactions afin de produire plus d'énergie lorsque cela est nécessaire.

Le froid est également un facteur externe qui agit sur le métabolisme de la cellule. En effet, une baisse de température ralentit l'efficacité catalytique des enzymes dans les réactions, change la conformation des lipides qui a pour conséquence de modifier la fluidité des membranes et donc tous les transports qui leur sont associés. Le froid entraîne également la déshydratation lorsque des cristaux de glace se forment à l'extérieur de la cellule, voire une congélation du cytoplasme dans les cas extrêmes. Il a été démontré que lorsque des cultures de cellules de riz *Oryza sativa* sont soumises à un

stress au froid, par un passage à 10°C, l'expression de certains transcrits codant pour des enzymes glycolytiques est augmentée (Umeda *et al.*, 1994). C'est le cas pour les enzymes GAPDH et PGA kinase avec une augmentation de 1,3 fois, ATP-PFK et aldolase (1,5 fois) et la meilleure expression se trouve être pour la PK et la TPI (1,8 et 2 fois respectivement) (Umeda *et al.*, 1994). Il en est de même pour *Arabidopsis thaliana* qui soumis au froid, voit également une augmentation dans l'expression de certains transcrits comme par exemple ceux codant pour, l'hexokinase qui est augmentée de 2 fois (Kreps *et al.*, 2002), l'UDPG-pyrophosphorylase avec une induction significative (Ciereszko *et al.*, 2001) ou encore l'ADH (induction significative) (Jarillo *et al.*, 1993). Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre les augmentations de ces expressions et l'adaptation face au froid.

Mais l'un des stress les plus étudié dans la glycolyse est celui associé au manque d'oxygène qui apparaît lors d'inondations. En effet, la diffusion de l'oxygène dans ce contexte devient plus difficile : elle est environ 10 000 fois plus basse dans l'eau que dans l'air (Thomson et Greenway, 1991); les plantes passent alors d'un état de normoxie (taux normal d'oxygène qui assure un taux de respiration normal) à un état d'hypoxie (taux limité d'oxygène qui provient d'un mélange entre une respiration limitée et le métabolisme de fermentation) puis à un état d'anoxie (une absence complète d'oxygène qui est due à un arrêt de la respiration et du fonctionnement totale de la fermentation). Dans ce dernier cas, l'anoxie bloque le flux glycolytique vers la respiration. Le flux glycolytique est alors totalement redirigé vers les voies de la fermentation pour produire l'énergie métabolique nécessaire à la cellule. Les principaux produits du métabolisme anaérobique sont l'éthanol, le lactate et l'alanine. Tous dérivent du pyruvate, le dernier métabolite de la glycolyse produit par la PK (figure II-3). Le métabolisme en anoxie a

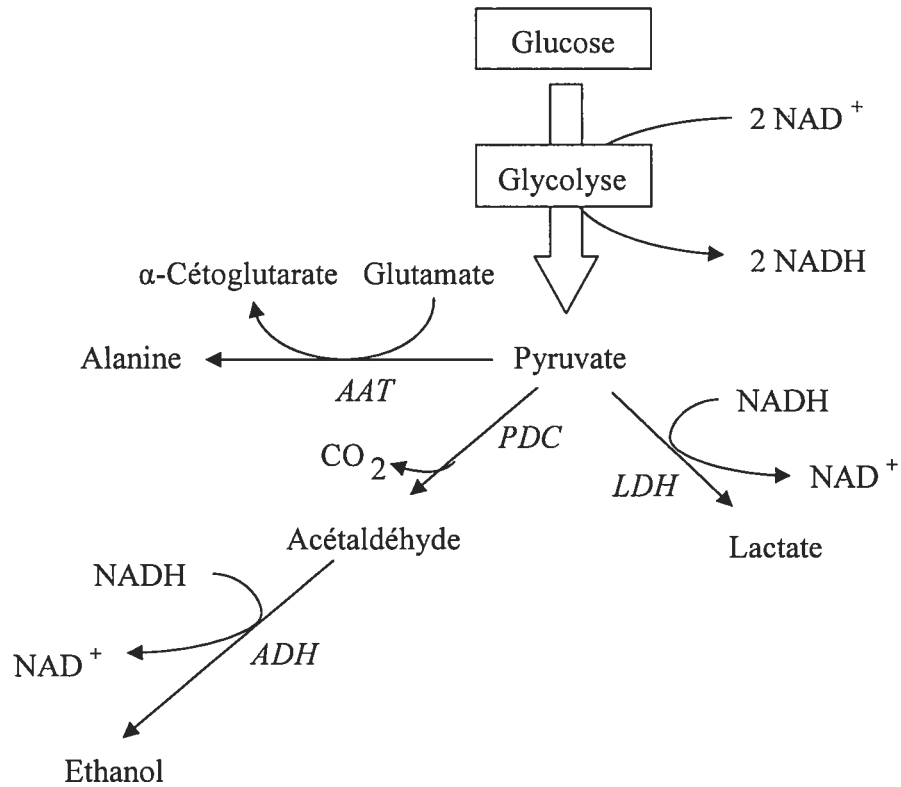


Figure II-3

Organisation des voies fermentaires. Les substrats et produits sont écrits en texte régulier et les enzymes sont en italiques.

Les abréviations sont les suivantes : (PDC) pyruvate décarboxylase, (ADH) alcool déshydrogénase, (LDH) lactate déshydrogénase, (AAT) alanine aminotransférase.

été largement étudié et de nombreuses enzymes de la glycolyse sont induites par le manque d'oxygène. Ceci est le cas pour la saccharose synthase du riz *Oryza sativa* (induction de 2,3 fois après 5 jours d'anoxie) (Ricard *et al.*, 1991), induction également de la PGM, de la PGI, de l'aldolase, de la GAPDH-NADP (*O. sativa*) respectivement par 1,4 fois, 1,7 fois, 1,9 fois et de manière significative, après 24h d'anoxie (Rivoal *et al.*, 1989 ; Fox *et al.*, 1995). L'induction de ces enzymes pendant l'anoxie, permet à la glycolyse de toujours générer du pouvoir réducteur sous la forme du NADH. La génération continue d'ATP est assurée par les fermentations lactiques et éthanoliques qui recyclent le NADH en NAD.

La PK, comme il a été énoncé précédemment, se trouve à la charnière entre la glycolyse et les voies de la fermentation par l'intermédiaire du produit formé, le pyruvate. Il a été montré dans les graines de ricin *Ricinus communis* en germination qu'il y avait une augmentation de l'activité PK lors d'un passage de normoxie en anoxie (Kobr et Beevers, 1971). En effet, les auteurs ont observé une diminution significative *in vivo* du rapport [PEP]/[pyruvate], au moment du passage en anoxie de graines de ricin en germination âgées de 5 jours. Cette modification de rapport se passe dans les 10 minutes suivant l'anaérobiose, indiquant une amélioration de l'activité PK (Kobr et Beevers, 1971). Cela montre que cette enzyme est importante en condition de stress anoxique. De plus, pendant les 15 premières minutes après le début de l'anoxie, le taux en ATP baisse et se stabilise par la suite à un taux 3 fois plus faible qu'en normoxie (Kobr et Beevers, 1971). L'arrêt de la diminution pourrait être due à l'augmentation de l'activité PKc induite par l'anoxie qui permettrait alors de produire plus d'ATP (Podestá et Plaxton, 1991). C'est pourquoi, il a été avancé que la PKc pourrait jouer un rôle important dans l'adaptation au stress anoxique (Podestá et Plaxton, 1991).

3- La régulation de la glycolyse

Nous avons vu que la glycolyse alimente plusieurs voies du métabolisme et qu'elle est impliquée dans la résistance aux stress. Sa régulation est donc d'une très grande importance.

La glycolyse peut-être régulée par 2 types de contrôles métaboliques : le "coarse control" et le "fine control" (Plaxton, 1996).

Le "coarse control" agit sur l'expression des gènes pour réguler les voies métaboliques. La cellule induit ou réprime un ensemble de gènes spécifiques en réponse à un état spécifique du tissu. Ce type de contrôle a été étudié sur des graines en germination et en développement (Botha *et al.*, 1992), sur des cultures de tissus et de cellules (Duff *et al.*, 1989) ou encore sur des protéines pour lesquelles les gènes sont induits en conditions anaérobiques, comme l'aldolase cytosolique ou l'alcool déshydrogénase (Kennedy *et al.*, 1992). De plus, une revue du "coarse control" en condition de stress a été faite récemment (Rivoal *et al.*, 2004). A la suite de cette modification d'expression génique, la quantité d'une enzyme donnée est modifiée, affectant à son tour le flux à travers la voie dans laquelle cette enzyme fonctionne. Cette modification se met en place après plusieurs heures à l'inverse du "fine control" décrit plus tard. Le "coarse control" peut également impliquer la durée de vie d'une protéine. En effet, la quantité d'une enzyme dans la cellule est le résultat d'un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation. Par exemple, les isoformes de la pyruvate kinase ont été analysées dans les graines de tabac en développement et il a été démontré que l'expression de ces isoformes pourraient être contrôlées par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels et que l'isoforme plastidique avait un cycle

synthèse-dégradation plus important que l'isoforme cytosolique (Gottlob-Mc Hugh *et al.*, 1995).

La glycolyse peut également être régulée par le "fine control". Les mécanismes de ce contrôle agissent sur l'activité des enzymes et sont généralement rapides (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes). Ils coûtent moins d'énergie que le "coarse control" et augmentent/diminuent l'activité des enzymes en changeant l'environnement immédiat de l'enzyme et/ou en changeant la structure de l'enzyme elle-même. Ces mécanismes ont été mis en place pour réguler les intermédiaires de la glycolyse avec les voies métaboliques connexes et pour coordonner le flux glycolytique avec les besoins de la cellule, en terme d'énergie et de précurseurs anaboliques. Il a été démontré que dans le "fine control" de la glycolyse des plantes et non végétale, les points de contrôles s'exerçaient au niveau de la conversion des hexoses en hexoses-P, du Fru-6-P en Fru-1,6-P2 et du PEP en pyruvate. Il existe différents mécanismes de "fine control", présents dans la régulation glycolytique chez les plantes, qui modulent l'activité d'enzymes préexistantes. Ces mécanismes sont énoncés ci-dessous et brièvement décrits (Plaxton, 1996). L'ordre de description ne traduit pas leur importance dans la cellule :

(1) Une variation dans la concentration en substrat et cosubstrat : les enzymes répondent aux changements de concentration en substrat en modifiant leur vitesse de réaction ($V=f([S])$). Il est à noter qu'à saturation, en revanche, il n'y a plus de variation de vitesse avec la variation de substrat. Par exemple, l'activité de la PEPC de feuille de maïs augmente avec l'augmentation de la concentration en PEP cytosolique jusqu'à saturation de l'enzyme par son substrat à une concentration de 2,5-3 mM (Hayakawa *et al.*, 1981).

(2) Le rôle d'effecteurs : les enzymes à multiples sous-unités peuvent avoir des sites de liaison pour les effecteurs, des molécules qui ont pour effet d'activer ou d'inhiber l'activité enzymatique. La liaison de cet effecteur sur un site de l'enzyme modifie la conformation de l'enzyme en la rendant plus ou moins active. Il a été démontré que la PFK était inhibée par le PEP et que cette inhibition était réversée par l'activateur Pi. Le rapport Pi/PEP pourrait s'avérer critique dans la régulation de l'activité PFK *in vivo* (Häusler *et al.*, 1989).

(3) La variation du pH : L'activité d'une enzyme peut également être dépendante du pH. En effet, le pH cytosolique se situe normalement entre 7.2 et 7.5, mais il peut fluctuer en réponse à des facteurs environnementaux : un mécanisme naturel comme les pompes à protons dans la photosynthèse par exemple (Falkner *et al.*, 1976) ou encore un stress, comme l'anoxie peuvent modifier le pH (Roberts *et al.*, 1984, a et b). Il a été démontré chez les racines que lors du passage d'un état normoxique à un état anoxique, on observait une augmentation rapide de la quantité de lactate. Cette accumulation de lactate dans la cellule diminue le pH cytoplasmique, en conséquence cette acidification inhibe progressivement la LDH et active la première enzyme de la voie de fermentation, la PDC (Davies *et al.*, 1974; Roberts *et al.*, 1984, a et b).

(4) Les associations réversibles de complexes multienzymatiques également appelées métabolons. Le milieu cellulaire est extrêmement concentré en protéines. Sous certaines conditions, certaines enzymes peuvent s'associer entre elles. Ce mécanisme de régulation serait utilisé dans le contrôle des enzymes du cycle de Calvin (Hrazdina *et al.*, 1992). L'avantage de ce complexe multienzymatique permet aux métabolites d'être acheminés d'une enzyme à une autre dans un environnement proche. De plus, leur concentration locale est plus élevée que dans le reste de la cellule et cela limite les

diffusions possibles. La découverte récente d'une association d'enzymes glycolytiques à la surface de la mitochondrie (Giegé *et al.*, 2003) laisse à penser que la glycolyse végétale puisse être organisée sous forme de métabolon.

(5) Les modifications covalentes réversibles: Il en existe plusieurs, mais le processus de phosphorylation-dephosphorylation est l'une des modifications covalentes réversibles la plus utilisée dans la régulation des enzymes eucaryotes. On peut citer la régulation de la PEPC qui est soumise à cette phosphorylation. La PEPC kinase phosphoryle la PEPC, en changeant ses propriétés cinétiques. En effet, il a été montré que l'enzyme PEPC phosphorylée est 75 fois moins sensible à l'inhibition par le malate et par conséquent, pour la même concentration de substrat (PEP), cette forme possède une activité spécifique supérieure comparativement à une enzyme PEPC non phosphorylée.

(6) Les interactions protéines-protéines: Certaines enzymes sont sujettes à l'inhibition/activation par d'autres protéines. Par conséquent, les interactions entre les enzymes sont un facteur important dans la régulation métabolique. Il a été décrit dans une revue (Traut, 1994) que ce type de contrôle pourrait avoir un rôle important dans la régulation *in vivo* de 13 enzymes dans le métabolisme des glucides non végétal. Dans le métabolisme végétal, l'activité de la nitrate réductase (NR) est modulée par des processus de phosphorylation et d'interactions protéines-protéines. En effet, la NR est déphosphorylée par une protéine phosphatase pendant la journée et phosphorylée (NR-P) par une nitrate réductase kinase pendant la nuit. Cette phosphorylation ne modifie pas son activité, mais permet à la NR de devenir la cible de la protéine inhibitrice de la nitrate réductase (NIP). NIP appartient à la famille des protéines 14-3-3, qui constitue une grande famille de protéines de régulation du métabolisme primaire chez les plantes (Bachmann *et al.*, 1996). NIP se lie à la NR phosphorylée en l'inactivant. Soit le

complexe (NR-P/NIP) reste à l'état inactif, soit il est reconnu par la machinerie de dégradation cellulaire et est protéolysé.

Malgré certains mécanismes communs à la glycolyse animale et végétale, la régulation ne s'effectue pas de la même manière. Chez les animaux, la régulation a lieu du haut vers le bas de la voie à travers une activation allostérique de la pyruvate kinase par le fructose 1,6-bisphosphate, produit de la PFK-ATP dépendante (Jurica *et al.*, 1998). Cette dernière est considérée comme le principal régulateur du flux glycolytique chez les animaux. En revanche, cette activation n'a pas lieu chez les plantes où il existe une régulation du bas de la voie vers le haut c'est-à-dire une rétroinhibition du PEP sur la PFK-ATP dépendante (Häusler *et al.*, 1989).

Les 2 types de régulation énoncés ci-dessus ne sont qu'un aperçu simplifié de la régulation glycolytique. En effet, les enzymes glycolytiques chez les animaux et chez les plantes ont été largement étudiées et montrent une expression régulée de manière tissu et développement dépendante. Il est également fréquent de trouver une enzyme sous plusieurs isoformes avec des propriétés immunologiques et cinétiques différentes (Rivoal *et al.*, 1996 et 2001). Afin de mieux comprendre la régulation de voies métaboliques, l'analyse du contrôle métabolique permet une approche quantitative et intégrée du contrôle exercé sur une voie.

4- L'analyse du contrôle métabolique

L'analyse du contrôle métabolique est une méthode qui permet d'analyser comment le contrôle du flux et les concentrations en intermédiaires métaboliques dans une voie métabolique sont distribués parmi l'ensemble des différentes enzymes qui constituent cette voie. Une vision classique et maintenant périmée est que le contrôle du flux métabolique d'une voie est limitée à une ou quelques étapes clés catalysées par des enzymes dites "limitantes". Cette vision est restrictive et ne considère pas une voie métabolique dans son ensemble, mais s'arrête aux caractéristiques cinétiques propres à une enzyme.

La théorie du contrôle métabolique développée par Kacser et Burns (1973) explique que le contrôle d'un flux n'est pas limité à une ou quelques enzymes, mais que le contrôle sur le flux métabolique d'une voie est partagé de manière quantitative entre toutes les enzymes de cette voie métabolique. Depuis les années 1980, la théorie du contrôle métabolique a laissé sa place au terme, "l'analyse du contrôle métabolique" (Metabolic Control Analysis, MCA), car les auteurs revendiquent que l'analyse du contrôle métabolique est plus une méthode pour analyser la distribution d'un flux sur une voie qu'une théorie en elle-même. Cette analyse permet entre autres de répondre à la question suivante: *"De combien le flux est-il modifié dans une voie métabolique lorsqu'on modifie la quantité d'une enzyme ?"* ou en d'autres termes *"Quel est l'effet d'une enzyme sur le flux métabolique de la voie dans laquelle elle est impliquée ?"* Cette analyse utilise des mutants ou des organismes génétiquement modifiés ayant des niveaux altérés d'une enzyme. La mesure du flux sur la voie, qui est une quantité de produit formé par unité de temps, par poids frais, peut être mesurée de plusieurs façons (Fell,

1992). Pour chaque plant transgénique avec une activité modifiée pour une enzyme, on associe une mesure de flux. On peut alors déduire un coefficient de contrôle de flux (FCC) d'une enzyme qui correspond à la pente d'un graphique ayant pour abscisse, les niveaux d'activités altérées pour une enzyme dans une population et en ordonnée, les mesures du flux correspondant à chaque clone. Ce FCC reflète le contrôle d'une enzyme sur une voie métabolique dans laquelle elle est impliquée. La théorie considère que la somme des FCCs des enzymes d'une voie est égale à 1. Par conséquent, la valeur d'un FCC d'une enzyme par rapport à la somme des FCCs, donne le contrôle relatif de cette enzyme sur la voie. C'est pourquoi, on peut quelquefois observer un contrôle plus fort de certaines enzymes sur une voie, malgré la théorie que le flux soit partagé sur la voie métabolique entière. Cette approche de l'analyse du contrôle métabolique pourra être appliquée à la PKc une fois que l'on aura généré des individus ayant des niveaux de PKc altérés.

5- La pyruvate kinase

Mon projet portait donc plus particulièrement sur la pyruvate kinase (PK), une ATP : pyruvate phosphotransférase (EC 2.7.1.40), une enzyme considérée comme clé dans la régulation de la glycolyse (Plaxton, 1996). Elle catalyse la dernière étape de la voie en phosphorylant un des substrats, l'ADP à partir du PEP produisant du pyruvate et de l'ATP (figure II-1). Cette réaction est irréversible car la déphosphorylation du PEP donne une molécule instable de pyruvate sous la forme *enol*. Cette forme est stabilisée par un passage direct à la forme *kéto*. Le PEP et le pyruvate sont 2 métabolites

importants de la glycolyse, situés à des points de branchement et qui sont impliqués dans de nombreuses voies de synthèse comme indiqué plus haut.

Le PEP génère une grande énergie qui peut-être utilisée dans les voies anaboliques. Il participe à 4 autres réactions enzymatiques, en plus de celle catalysée par la PK. La première est catalysée par la PEP phosphatase (PEPase) (figure II-1). Cette enzyme est probablement localisée dans la vacuole (Duff *et al.*, 1991b.), elle agit en hydrolysant une molécule de PEP pour donner du pyruvate en libérant une molécule de phosphate inorganique. La deuxième réaction est catalysée par la PEP carboxylase (PEPC) (figure II-1) qui carboxyle de manière irréversible le PEP pour donner de l'oxaloacétate et du phosphate inorganique. La dernière réaction est catalysée par l'énolase (figure II-1), dans le sens de la gluconéogenèse. Elle produit du 2-PGA à partir du PEP. De plus, comme il a été énoncé ultérieurement, le PEP est également impliqué dans la voie de synthèse des acides aminés aromatiques, avec un composé de la voie des pentoses-phosphates, l'erythrose 4-phosphate (figure II-2). Dans la voie de synthèse des acides aminés aromatiques, le PEP sert de substrat dans les réactions catalysées par la 3-déoxy-D-*arabino*-heptulosonate-7-phosphate synthase et la 5-*énol*pyruvylshikimate-3-phosphate synthase.

Quant au pyruvate, il fournit des voies métaboliques et est impliqué dans les voies de la fermentation (figure II-3). Il sert de substrat à 2 réactions catalysées par la pyruvate décarboxylase (PDC) et la lactate déhydrogénase (LDH). Les produits terminaux sont le lactate et l'éthanol. Comme il a été mentionné précédemment, le pyruvate est impliqué dans la synthèse de certains acides aminés (alanine, valine, leucine) et de l'acétyl-CoA, lui-même impliqué dans la synthèse des acides gras et dans le cycle de Krebs (figure II-2). Le PEP et le pyruvate étant des métabolites situés à des points de branchements qui

lient le mécanisme du carbone avec d'autres voies de synthèse, il est très intéressant d'élucider les propriétés cinétiques et de régulation de la PK, qui se trouve à la charnière entre la glycolyse et le cycle de Krebs .

La PK a été purifiée et caractérisée à partir de nombreuses sources, à la fois animales et végétales. La plupart des enzymes d'origine animale sont des homotétramères avec des sous-unités de poids moléculaires variables compris entre 55 et 62 kDa. Il existe 4 isoformes chez le mammifère, R, L, M1 et M2 qui sont situées dans le cytosol (Yamada et Noguchi, 1999). Elles sont régulées de manière allostérique, exceptée pour l'isoforme M1. Les différentes isoformes sont spécifiques d'un tissu et présente une régulation dépendante de l'état du développement, des hormones et de la nutrition. Les isoformes R et L possèdent la caractéristique supplémentaire d'être régulées par une phosphorylation réversible médiée par une protéine kinase A (Fothergill-Gilmore et Michels, 1993). Chez les plantes vasculaires et les algues vertes, la PK est présente à la fois dans le cytosol et le plaste. Ces isoformes n'ont pas les mêmes caractéristiques biochimiques, immunologiques et physiques. Elles se trouvent sous des formes différentes, suivant la nature du tissu étudié et de son état de développement. On les trouve sous forme de monomère, d'homotétramère, d'hétérotétramère ou encore d'hétérohexamère. La présence de ces multiples formes rend les études de comparaison de la PK entre les espèces difficile. En effet, il existerait chez *A. thaliana* au moins 7 gènes codant pour différent polypeptides (« *Arabidopsis* Genome Initiative ») et 5 gènes additionnels pour des PK-like proteins (Plaxton *et al.*, 2002). Quant à la pomme de terre, il existerait au moins 6 gènes codant pour la PKc (Cole *et al.*, 1992).

D'un point de vue biochimique, l'activité PK est absolument dépendante de la présence simultanée d'ions monovalents et bivalents, le potassium (K^+) et le magnésium (Mg^{2+}). Les mesures de cinétiques de la PKc à l'état stationnaire montrent des courbes de saturation hyperbolique. Son activité est également modulée par des effecteurs: elle est activée par l'acide aminé L-aspartate chez le colza, *Brassica napus* (Smith *et al.*, 2000), mais également par le glucose 1-phosphate, le glucose 6-phosphate, l'isoleucine et le DHAP chez l'algue verte, *Selenastrum minutum* (Lin *et al.*, 1989). La présence de ces activateurs facilite la liaison de la PKc au substrat PEP. Elle peut également être inhibée par le L-glutamate, l'oxalate, la quercétine, la rutine chez le colza, *Brassica napus* (Smith *et al.*, 2000), par le citrate de magnésium, l'oxalate de magnésium, le phosphate inorganique, l'ATP de magnésium, la tyrosine, la glycine, le 2,3-diphosphoglycerate, le 3-phosphoglycerate ou encore par le fructose 1,6-bisphosphate chez l'algue verte, *Selenastrum minutum* (Lin *et al.*, 1989). Il existe également d'autres inhibiteurs dans les graines de ricin en germination, qui sont l'AMP, l'isocitrate, l' α -cétoglutarate, le malate, le 2-phosphoglycérate, le glycérol 3-phosphate et le phosphoglycolate (Podestá et Plaxton, 1991).

D'après ces études d'activation et d'inhibition, un modèle a été déterminé impliquant une régulation allostérique coordonnée de la PKc et de la PEPC (Moraes et Plaxton, 2000) via les effecteurs L-glutamate et L-aspartate fournissant un mécanisme pour le contrôle du flux glycolytique cytosolique et la répartition du PEP pendant et après l'assimilation de NH_4^+ (Smith *et al.*, 2000). Ce modèle montre une coordination entre le métabolisme du carbone et de l'azote dans les cellules en suspension de *Brassica napus*. L'azote est assimilé sous forme NH_4^+ , au niveau du plaste. Il y a formation de glutamate via le système glutamine synthétase / glutamine α -cétoglutarate

aminotransférase (GS/GOGAT) avec pour accepteur de NH_4^+ , une molécule de α -cétoglutarate. Cet approvisionnement de squelette carboné se fait par les voies de la glycolyse et du cycle de Krebs. Le glutamate est transporté dans le cytosol et inhibe la PKc. Cela redirige le flux de la glycolyse sur l'enzyme PEPC. Cette enzyme produit de l'oxaloacétate qui est réquisitionné (en plus d'une molécule de glutamate) par l'aspartate aminotransférase (AAT) pour donner une molécule d'aspartate et une molécule de α -cétoglutarate. L'aspartate, à son tour, va rétroinhiber la PEPC et réverser l'inhibition du glutamate sur la PKc. Cette rétroinhibition redirige le flux vers la PKc. Ce modèle souligne donc le rôle des acides aminés L-aspartate et L-glutamate dans le contrôle du flux glycolytique et la répartition du PEP, via l'activation/inhibition de la PKc, lors de l'assimilation de l'azote.

D'autres données soulignent l'importance de la PKc dans la glycolyse. Une étude sur la régulation de la glycolyse a été effectuée (Thomas *et al.*, 1997) et il a été déduit que le contrôle de la glycolyse se trouverait après la déphosphorylation du PEP, c'est-à-dire, au niveau de la réaction catalysée par la PKc. En effet, il a été émis comme hypothèse qu'une réduction dans la quantité de PEP, conséquence d'une suractivation de la PKc, augmenterait le flux glycolytique en levant l'inhibition de la PFK, car le PEP est un inhibiteur efficace de la PFK-ATP dépendante (Häusler *et al.*, 1989).

Une première tentative de surexpression de la PK a été tenté chez le tabac *Nicotiana tabaccum* (Gottlob-McHugh *et al.*, 1995). L'ADNc de la PKc du tubercule de la pomme de terre a été fusionné au peptide de transit de la petite sous-unité de la rubisco du pois, sous le contrôle du promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur 35S, pour lui donner une destination plastidique. Des feuilles de plants de tabac ont été transformées par *Agrobacterium tumefaciens*, contenant cette construction. L'isoforme

cytosolique a été choisi afin de contourner les systèmes de régulation qui existent dans le plaste. La tentative de surexpression de la PK a échoué et à la place, les auteurs ont trouvé 2 plants transgéniques qui montraient une absence totale de PKc dans les feuilles. Les expressions de la PKc endogène et de la PKc transgène ont été totalement supprimées des feuilles de plants de tabac. Ce phénomène a été associé à un mécanisme de co-suppression sans jamais avoir été démontré formellement. Malgré cela, les plants montraient une croissance et une reproduction normales. Il est surprenant que des plants sans activité PKc puissent survivre; par conséquent, des moyens de contournement ont dû se mettre en place, comme l'action de la PEPase ou encore de l'ensemble PEPC/MDH/ME afin de produire du pyruvate en quantité suffisante, nécessaire au fonctionnement de la cellule (Day et Hanson, 1977 ; Plaxton, 1996).

Une autre étude a apporté des détails supplémentaires sur la régulation post-traductionnelle de la PKc dans les graines de soja en développement (Tang *et al.*, 2003). Par des analyses de séquence, il a été trouvé qu'il pourrait exister deux sites potentiels de phosphorylation sur des résidus sérines. Les auteurs ont généré des anticorps contre la sérine phosphorylée et ont réussi à détecter les 2 sites de phosphorylation sur la PKc. Dans la suite de leur étude, les auteurs ont trouvé par immunoprécipitation que les polypeptides PKc phosphorylés étaient couplés à des ubiquitines. Ils ont démontré que la PKc était soumise à une dégradation par le protéasome, médiée par une ubiquitination. De plus, ils ont montré qu'il pourrait exister une deuxième régulation par troncation de la PKc en position C-terminale. En effet, au cours du développement des graines de soja, le polypeptide de 55 kDa (taille normale attendue) disparaît progressivement et parallèlement, un polypeptide de 51 kDa apparaît. De façon surprenante, ce polypeptide possède toujours l'activité PK et se trouve activé par l'effecteur allostérique, l'aspartate.

On peut conclure qu'en fonction des besoins métaboliques de la cellule, les organismes ont développé différentes formes de PK. Elles sont régulées par des mécanismes nombreux et variés afin d'adapter l'offre en fonction des demandes métaboliques de la cellule et que ces mécanismes de régulation restent à être élucidés.

III- Matériel et Méthodes

1- Matériel biologique

1- 1. Matériel végétal

Des tubercules matures de pomme de terre *Solanum tuberosum* (cultivar Russet Burbank) ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été stockés à 4°C et à 98% d'humidité relative après récolte. Ils étaient amenés à température ambiante pendant 24 heures avant d'être semés. Ils ont été plantés dans des pots contenant un mélange de terre de culture composé de terreau, de vermiculite, de sable et de tourbe (2:1:1:1). Les pots ont été placés dans une chambre de croissance à une température de 22°C avec une période d'éclairage de 12 heures. Les plants de pomme de terre ont commencé à être arrosés après deux semaines de croissance avec une solution contenant un fertilisant de type N/P/K (20/20/20), de manière hebdomadaire. Les plants ont été conservés jusqu'à leur utilisation, c'est-à-dire entre 3 et 6 semaines de croissance. Les tiges de ces plants ont été utilisées pour la transformation par *Agrobacterium rhizogenes*.

1- 2. Bactérie *Escherichia coli*

Nous avons utilisé des bactéries compétentes *Escherichia coli* de type HB 101, généreusement préparées et données par Dr Sonia Dorion (Université de Montréal). Les cultures d'*E.coli* sont incubées à 37°C sous forte agitation dans un milieu de culture de type LB (Luria-Bertani) contenant 10g/l de bactotryptone, 5g/l d'extrait de levure et 5g/l de chlorure de sodium. Le pH du milieu de culture est ajusté à 7,5 avec de l'hydroxyde

de sodium (NaOH) avant d'être autoclavé. Le milieu solide a été obtenu en ajoutant 15g/l de Bacto-agar.

1- 3. Bactérie *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes, souche A4 (Petit et Tempé, 1978) a été utilisée comme vecteur de transformation lors de la transformation de tiges de pomme de terre. Les cultures de *A. rhizogenes* sont incubées à 28°C dans le noir dans un milieu de culture de type MYA (mannitol, yeast, ammonium) (Petit *et al.*, 1983). Ce milieu contient 5g/l d'extrait de levure, 0,5 g/l d'hydrolysât de caséine, 8 g/l de mannitol, 2g/l de sulfate d'ammonium et 5 g/l de chlorure de sodium. Le pH du milieu est ajusté à 6,6 avec du NaOH avant d'être autoclavé. Pour le milieu solide, 15g/l de Bacto-agar est ajouté et les boîtes de culture sont stockées à 4°C, à l'abri de la lumière. Elles ne sont pas conservées plus de 4 semaines.

2- Produits chimiques

Tous les produits chimiques utilisés proviennent des compagnies Sigma-Aldrich, (Mississauga, Ontario, Canada) et Fisher Scientific, (Mississauga, Ontario, Canada) exceptés dans certains cas, ce qui est alors mentionné.

3- Vecteur de clonage

L'ADN étranger est inséré dans le vecteur d'expression binaire pGA643 (An *et al.*, 1988) chez l'hôte *E. Coli*. Par la suite, le plasmide entier est transféré et se réplique dans la souche A4 d'*A.rhizogenes* qui sert de vecteur de transformation.

Le vecteur pGA643 a une longueur totale de 11,6 kb. Il possède le promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur qui permet l'expression du gène d'intérêt inséré dans le vecteur dans tous les tissus. Le promoteur fort est situé sur un fragment d'ADN de 419 pb (-418 à +1), localisé en amont du site de clonages multiples. Ce vecteur porte, en aval du site de clonage multiple le terminateur de transcription de la nopaline synthase qui arrête la transcription du transgène. Ce plasmide possède les gènes de résistance aux antibiotiques tétracycline et kanamycine comme marqueurs de sélection. Lorsqu'il est inséré dans la souche bactérienne *E.coli*, les antibiotiques kanamycine et tétracycline sont utilisés aux concentrations respectives de 10 mg/l et 2 mg/l. Pour une culture de *A. rhizogenes*, les concentrations sont 25 mg/l pour la kanamycine et 5 mg/l pour la tétracycline. Le vecteur pGA643 a été utilisé avec succès pour la génération de plantes sens et antisens avec de nombreux gènes.

4- ADN complémentaire de la PK

L'ADN complémentaire codant pour l'isoforme cytosolique de la PK de pomme de terre *Solanum tuberosum* (PKc) (numéro d'accèsion : X53688), cultivar Kennebec (Blakeley *et al.*, 1990) nous a été généreusement donné par Dr. K. Cole et Dr. D. Dennis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada. La longueur totale de la séquence nucléotidique est de 2006 pb (figure III-1). Cet ADN complémentaire a été isolé à partir d'une banque d'ADNc λ ZAP de pomme de terre *Solanum tuberosum*, criblée à l'aide d'un anticorps de lapin dirigé contre la pyruvate kinase cytosolique de l'endosperme de graines de ricin en germination (Blakeley *et al.*, 1990).

ccatgattac gccaagctcg **aaattaaccc** **tcactaaagg** gaacaaaagc tggagctcca **Amorce T3**
 ccgcgggtggc ggccgctcta gaactagtgg **atccccggg** ctgcaggaat tccggaattc **BamHI/SmaI**
 cctggcaaaa gcacaagaaa caaacagtag cactaaaatc ttgaaggggt ggtttagctt
 gatctgtagc ttttgttagt gactgataaa tagaagaa**AT** Ggccaacata gacatagctg
 gaatcatgaa ggatctccca aatgatggcc gtattccaaa gaccaagatt gtttgacgt
 tagggccatc **ttctagaaca** **gtgccaatgc** **tggagaagct** tctccgtgct ggcatgaacg **Amorce PKC3**
 ttgccagggt taacttttct catgggaccc atgagtacca tcaggagaca ttggacaatc
 ttaagattgc tatgcagaat actcagatcc tgtgtgctgt catgcttgac accaaggggc
 ctgagattcg tactggtttc ttaacagatg gaaaaccgat tcagcttaag gaaggtcaag
 aaatcactgt atccacagac tataccataa aaggaaatga agaaatgat tcaatgagct
 ataagaagtt ggtaatggac ttgaagcccg gcaataccat tttgtgtgca gatggtacca
 taacccttac tgttttgtca tgtgatccac cgtctggaac ggtgagatgt cgctgcgaga
 atactgccac cttaggagag aggaagaatg taaaccttcc aggtgtgggt gtggaccttc
 caacacttac agagaaggat aaagaagata tactagagtg ggggtgttcc aacaacattg
 atatgatagc gctttcgttt gtgcgtaagg **gttcagatct** tgtcaatggt cgcaaggttc **BglII**
 ttggtccaca tgccaagcgc attcaactaa tgtcaaaggt tgaaaaccaa gaaggggtaa
 tcaactttga tgaatcctt cgtgagacag attcttttat ggttgctcga ggtgatctcg
 gaatggaaat tccagttgag aagattttct tggctcagaa aatgatgata tacaagtgt**a**
atcttgctgg **caaagctgtg** gtaactgcc ctcagatgct tgaatcaatg atcaagtctc **Amorce PKC5**
 cagcaccac ccgtgctgag gctactgat tggctaatgc tgtcttggat ggcactgatt
 gtgttatggt aagtggggag agtgcagctg gtgcttatcc tgagctggca gtaaaaaatca
 tgtcacgaat ctgcattgag gcagagtctt cacttgacaa cgaggctatc ttcaaggaaa
 tgatcaggtg taccctactg ccaatgagcc cattggagag tcttgcatca tcagctgtcc
 gtacggctaa caaagctaga gcaaaactca ttgttgcct gacacgtggc gggagtacag
 caaagctggt tgccaagtat aggcctgcag ttcctattct gtcagtatgc gtgcctggtt
 tgaccacaga ctctttcgat tggccatca ggcagagac cccagctaga cacagtttg
 tatatagggg cttgattcca cttcttgggt aaggttctgc aaaggccact gattctgaat
 caactgaggt aatccttgaa gcgccctga agtctgccgt aacgagaggg ctatgcaaac
 ctgggtgatgc tgtcgtggca cttcatcgta ttggttctgc at**ccgttatc** **aagatttgcg** **Amorce PKC2**
tcgtgaagTA **Atcgtcgtgt** cacataacat acaaactctg aactccctcc **acctgagctc** **Amorce PKC4**
 agactgattt tcatttatgc tttctggtct tgataatgca ttattaatat gctgattttg
 tcacaatgtc ttagg**atatac** tagtattatc accaaggatt actatatttc atggtatatt **EcoRV**
 tcatatctgc ttcaaacact gga**tttaaaa** taaatattcc tttgggtgcag caatatcttt **PsiI**
 atgttgttgt atgtggtgta ggtgggggtg ataaaggctg ttttttgaa ctttcttgag
 gaatttttaa tgtaggacac tggaaagagt ttccattggc aactgattta ccatgttcca
 atggttcttt cattt**gtacc** **caattcgccc** **tatagtgagt** **cgattataca** **ttcactggcc**
 gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgтта cccaacttaa tcgccttgca

Figure III-1

A- Séquence nucléotidique de la PKc (séquence en noir) que nous avons déterminée et reconstituée à partir du clone inséré dans pBluescript SK(-) (séquence en bleu).

Les amorces utilisées sont notées en gras et soulignées. Les codons initiateur (ATG) et STOP (TAA) sont notés en gras et en majuscule.

Les sites de restriction utilisés dans le sous-clonage sont écrits en italique et soulignés.

tggcaaaagcacaagaacaacagtagcactaaaatccttgagggtggtttagcttga
 tctgtagcttttggtagtgactgataaatagaagaaatggccaacatagacatagctgga
 M A N I D I A G
 atcatgaaggatctcccaaatgatggccgattcceaagaccaagattgtttgcacgtta
 I M K D L P N D G R I P K T K I V C T L
 gggccatcttctagaacagtgccaatgctggagaagcttctccgtgctggcatgaacgtt
 G P S S R T V P M L E K L L R A G M N V
 gccaggtttaacttttctcatgggacctgagtagctaccatcaggagacattggacaatctt
 A R F N F S H G T H E Y H Q E T L D N L
 aagattgctatgcagaatactcagatcctgtgtgtctgctgctgctgacaccaaggggct
 K I A M Q N T Q I L C A V M L D T K G P
 gagattcgtactggtttcttaacagatggaaaaccgattcagcttaaggaaggtcaagaa
 E I R T G F L T D G K P I Q L K E G Q E
 atcactgtatccacagactataaccataaaaggaatgaagaaatgatctcaatgagctat
 I T V S T D Y T I K G N E E M I S M N I D
 aagaagttggtaatggacttgaagcccggcaataaccattttgtgtgcagatggtaccata
 K K L V M D L K P G N T I L C A D G T I
 acccttactgtttgtcatgtgatccaccgctctggaacgggtgagatgtcgtgctgcgagaat
 T L T V L S C D P P S G T V R C R C E N
 actgccaccttaggagagaggaagaatgtaaaccttccagtggtgtgtggaccttcca
 T A T L G E R K N V N L P G V V V D L P
 acacttacagagaaggataaaagaagataactagagtggggtggttcctaacaacattgat
 T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D
 atgatagcgctttcgttgtgctgaagggttcagatcttgtcaatgctcgcaagggttctt
 M I A L S F V R K G S D L V N V R K V L
 ggtccacatgccaagcgcattcaactaatgtcaaaggttgaaccacaagaaggggtaatc
 G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G V I
 aactttgatgaaatccttctgtgagacagattctttttaggttgctcgaggtgatctcgga
 N F D E I L R E T D S F M V A R G D L G
 atggaaattccagttgagaagattttcttggtcagaaaatgatgataacaagtgaat
 M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N
 ctgtgtggcaagctgtggtaactgccactcagatgcttgaatcaatgatcaagtctcca
 L A G K A V V T A T Q M L E S M I K S P
 gcaccacccgtgctgaggctactgatgtggctaatgctgtcttggatggcactgattgt
 A P T R A E A T D V A N A V L D G T D
 gttatgttaagtgaggagagtgagctgggtcttctcctgagctggcagtaaaaatcatg
 V M L S G E S A A G A Y P E L A V K I M
 tcacgaatctgacattgaggcagagcttctcacttgacaacagggtctatcttcaagaaaatg
 S R I C I E A E S S L D N E A I F K C N
 atcaggtgtacccccactgccaatgagccattggagagcttctgcatcatcagctgtccgt
 I R C T P L P M S P L E S L A S S A V R
 acggctaacaagctagagcaaaaactcattgtgtcctgacacgtggcgggagtacagca
 T A N K A R A K L I V V L T R G G S T A
 aagctggttgccaagtataggcctgcagttcctattctgtcagtagctgctgctggtttg
 K L V A K Y R P A V P I L S V V V P V L
 accacagactcttctgattggtccatcagcgacgagaccccagctagacacagtttggtga
 T T D S F D W S I S D E T P A R H S L V
 tataggggcttggattccacttcttgggaaggttctgcaaggccactgattctgaaatca
 Y R G L I P L L G E G S A K A T D S E S
 actgaggtaatccttgaagcggcctgaagtctgcccgtaacgagagggctatgcaaacct
 T E V I L E A A L K S A V T R G L C K P
 ggtgatgctgctggtgacctcatcgtattggttctgcatccgttatcaagatttgcgtc
 G D A V V A L H R I G S A S V I K I C V
 gtgaagtaatcgtgctgcacataacatacaaaatccttgaactccctccacctgagctcag
 V K
 actgattttcatttatgcttttctggtcttgataatgcattattaatagctgattttgtc
 acaatgctttaggatcttagtattatcaccaaggattactatatttcatgttatatttc
 atatctgcttcaaacctggathtaanaataatcttcttgggctgagcaatcttcttat
 gttgtgtatgtggtaggtgggggtgataaaggctgttttttgaacttcttgagga
 attttaatgtaggactggaaaggttcttcttgcaactgatttacatgttccaat
 ggttcttctttttgataaaaaaa

Figure III-1 (suite)

B- Séquence nucléotidique de la PKc de pomme de terre et sa traduction virtuelle. La partie codante est composée de 1530 pb correspondant à un polypeptide de 510 acides aminés. La masse prédite de la protéine est de 55 170 Da. Cette séquence possède des régions non traduites aux extrémités 5' et 3' de 97 pb et 378 pb respectivement. Elle possède également les résidus impliqués dans les sites de liaison au PEP (en gras) et à l'ADP/ATP (en gras et soulignés) (page 32).

Nous avons séquencé le clone qui nous a été envoyé afin de s'assurer de l'intégrité de l'ADNc. Pour cela, nous avons utilisé la séquence publiée et les amorces suivantes ont été choisies pour le séquençage : PKC2 (5'-GAC GCA AAT CTT GAT AAC GG-3'), PKC3 (5'-CCA GCA TTG GCA CTG TTC TA-3'), PKC4 (5'-TCA AGA TTT GCG TCG TGA AG-3'), PKC5 (5'-ACA GCT TTG CCA GCA AGA TT-3'), T3 (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'). Les résultats n'ont montré aucune erreur dans la séquence et nous avons pu déterminer que l'ADNc avait été inséré dans le plasmide pBluescript SK(-) entre les sites de restriction *KpnI* et *EcoRI*.

5- Constructions pour la transformation des tiges de pomme de terre et réactions de ligation dans le vecteur d'expression binaire pGA643

5- 1. En orientation sens

Deux constructions en orientation sens ont été choisies (figure III-2).

La première, nommée S1 a une longueur de 1775 pb et correspond à la région codante de la séquence nucléotidique de la PK. Cette construction S1 a été générée en coupant la séquence aux sites de restriction *SmaI* à l'extrémité 5' et *EcoRV* à l'extrémité 3'.

La deuxième, nommée S2 a une longueur de 2250 pb. Elle correspond à la partie codante flanquée de la partie non traduite après le site d'arrêt de la traduction. La séquence a été coupée aux sites de restriction *SmaI* à l'extrémité 5' et *PsiI* à l'extrémité 3'. Elle contient une partie du vecteur.

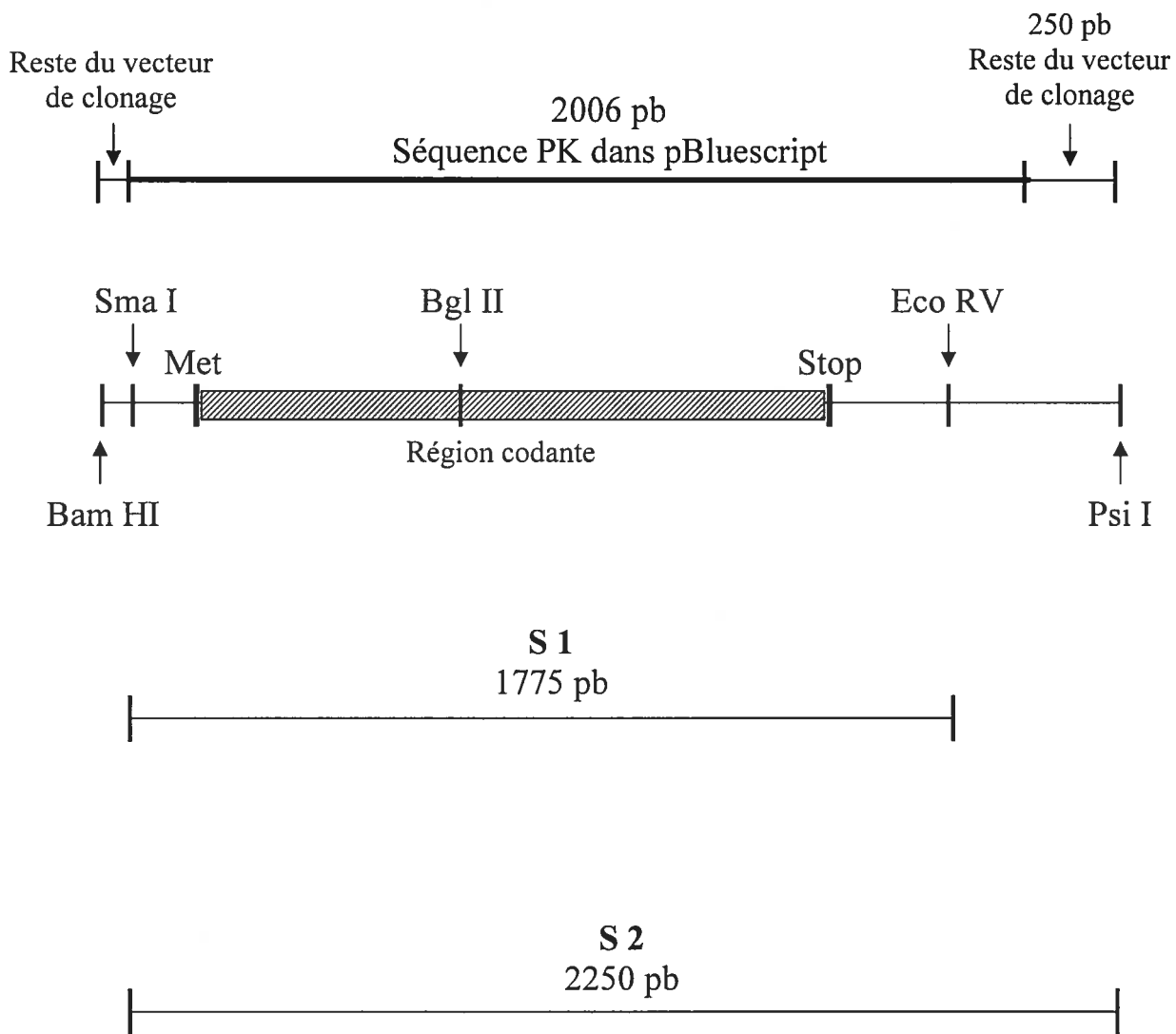


Figure III-2

Schéma représentant les différentes constructions sens choisies pour transformer les tiges de pomme de terre. Les sites de restriction uniques sont indiqués.

5- 2. En orientation antisens

Quatre constructions ont été choisies (figure III-3).

La première construction, AS1 a une longueur de 1000 pb. Elle correspond à la seconde moitié de la séquence codante de la PK. Cette dernière a été coupée aux sites de restriction *BglIII* et *EcoRV* respectivement aux extrémités 5' et 3'.

La deuxième construction, nommée AS2, possède une longueur de 775 pb et elle correspond à la première moitié de la séquence codante de la PK. Elle a été générée en coupant la séquence aux sites de restriction *BamHI* à l'extrémité 5' et *BglIII* à l'extrémité 3'.

La troisième construction, AS3 avec une longueur de 1775 pb, est la même que celle nommée S1. En revanche, elle a été insérée dans le vecteur pGA643 en sens inverse.

Il en est de même pour la construction AS4 qui, avec une longueur de 2250 pb correspond à la construction S2, mais insérée en sens inverse dans le vecteur pGA643.

5- 3. Construction contrôle

Pour la construction contrôle, celle qui va servir à générer plus tard les lignées racinaires de référence, dites « contrôle », nous avons utilisé le vecteur pGA643 vide c'est-à-dire sans aucune insertion.

5- 4. Réactions de ligation

Les réactions de ligation entre les constructions décrites ci-dessus et le vecteur pGA643, ont été réalisées en suivant le protocole fourni avec l'enzyme T4 DNA ligase

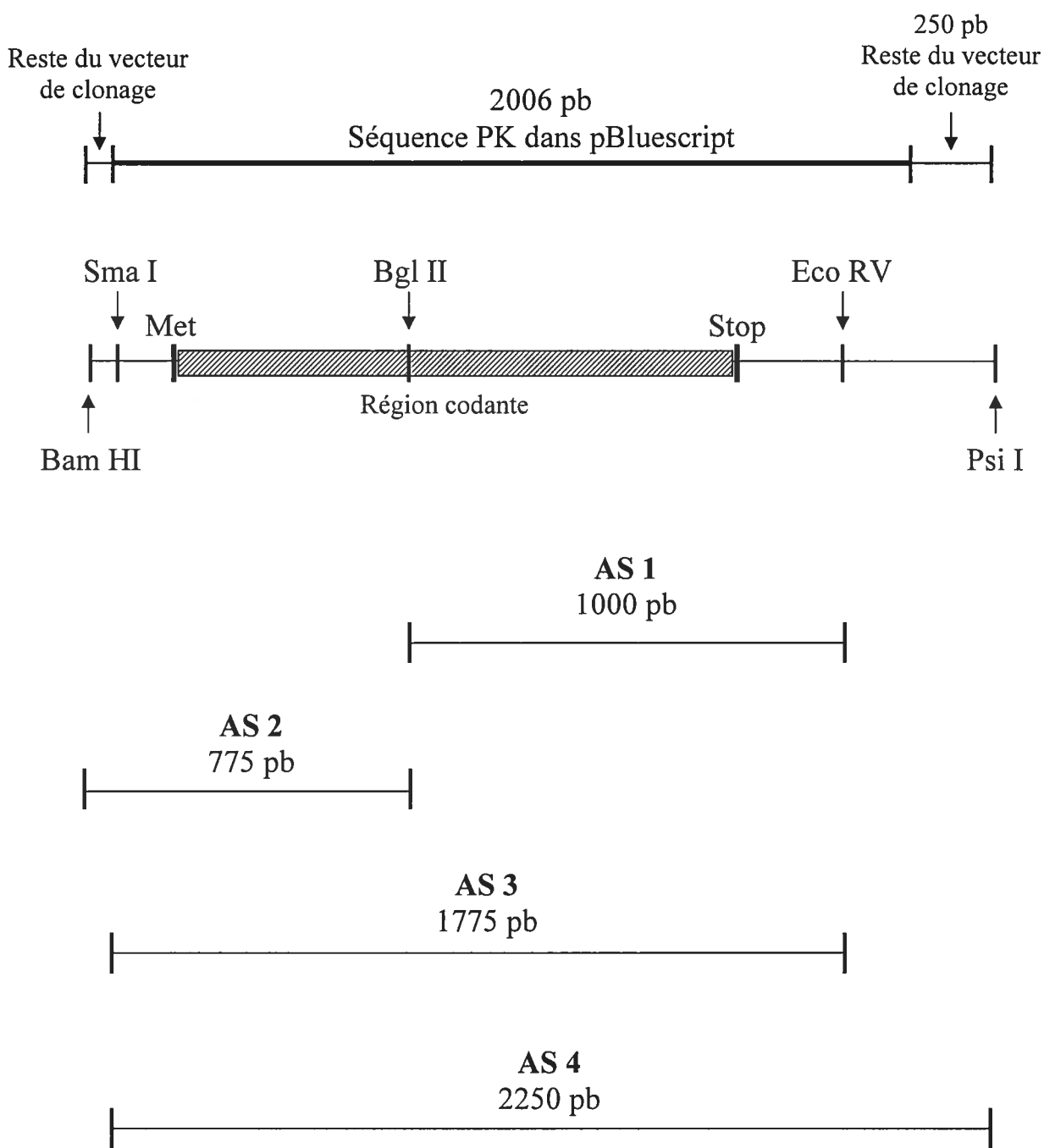


Figure III-3

Schéma représentant les différentes constructions antisens choisies pour transformer les tiges de pomme de terre. Les sites de restriction uniques sont indiqués.

(GIBCO BRL, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). La réaction est composée de 1 unité d'enzyme ligase, entre 90 et 360 fmoles d'insert pré-digéré, 55 à 65 fmoles de plasmide pGA643 pré-digéré, de tampon de réaction de ligation 5X, dans un volume final de 20 μ l. La réaction est incubée à 14°C entre 12 et 14h.

Dans les cas où le vecteur pGA643 a été digéré avec une enzyme générant des bouts francs, celui-ci a été déphosphorylé préalablement à la ligation, pendant 1h à 65°C en présence de phosphatase alcaline bactérienne (150 U/5 μ g de plasmide). Cette phosphorylation évite la recircularisation du plasmide et optimise donc l'efficacité de l'insertion du transgène dans le plasmide.

6- Transformation de bactéries compétentes *Escherichia coli* HB

101

Le produit de la réaction de ligation décrit précédemment (voir section III-5-d) est ajusté avec de l'eau pour obtenir un volume final de 100 μ l. Dans un microtube de 1,5 ml, 90 μ l de bactéries compétentes HB 101 sont mélangés à 100 μ l du produit de ligation et 10 μ l de TCM 10X (100 mM Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris)-HCl pH 7,5, 100 mM dichlorure de calcium (CaCl_2), 100 mM dichlorure de magnésium (MgCl_2). Le mélange est incubé 30 minutes sur la glace. On procède ensuite au choc thermique en plongeant les tubes dans un bain à 42°C pendant 2 minutes exactement. Immédiatement après le choc thermique, on ajoute à chaque microtube, 1 ml de milieu LB liquide, préchauffé et pré-agité à 37°C. Les tubes sont ensuite placés dans un incubateur préchauffé à 37°C, sans agitation. Après une heure d'incubation, les microtubes sont centrifugés 30 secondes et le culot est resuspendu délicatement dans

100 μ l de milieu LB. Pour finir, les produits de transformation sont étalés en deux volumes différents (10 et 90 μ l) sur des boîtes de culture contenant un milieu solide de type LB avec les antibiotiques kanamycine et tétracycline aux concentrations respectives de 10 mg/l et 2 mg/l. Les boîtes sont incubées à 37°C entre 12 et 16h.

Les colonies d'*E. coli* transformées sont sélectionnées et amplifiées dans 3,5 ml de milieu de culture liquide LB contenant les concentrations d'antibiotiques appropriées. Après une incubation à 37°C, durant 12 à 16h, elle sont stockées dans du LB contenant 25% (v/v) de glycérol et congelées instantanément dans l'azote liquide pour être ensuite entreposée à -80°C. Le reste de la culture est utilisé pour purifier l'ADN plasmidique (voir section III-7) dans le but de vérifier l'intégrité de la construction insert/plasmide par l'intermédiaire d'enzymes de restriction.

7- Purification d'ADN plasmidique à partir de culture bactérienne *E. coli* HB 101

Les cultures bactériennes liquides obtenues à partir de colonies transformées et sélectionnées avec les antibiotiques appropriés sont utilisées pour purifier les ADN plasmidiques et vérifier leur intégrité. Cette purification est effectuée à température ambiante, avec un protocole de type « mini-prep », basée sur une lyse alcaline. Un volume de 1,5 ml de culture bactérienne très dense est centrifugé dans un microtube pendant 1 minute à 16 000 rpm, dans une mini centrifugeuse. Le surnageant est enlevé et le culot est resuspendu en vortexant pendant 30 secondes, dans 100 μ l de tampon I (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA), 0,9 % (p/v) glucose), autoclavé et conservé à 4°C. On ajoute 200 μ l de tampon II (200 mM NaOH,

1% (p/v) sodium dodécyl sulfate (SDS)) conservé à température ambiante, puis on inverse 5 fois pour homogénéiser le mélange cellulaire. 150 µl de tampon III (3 M acétate de potassium (CH₃COOK), 1,6 M acide formique (HCOOH)) conservé à 4°C, sont ajoutés et mélangés en vortexant pendant 30 secondes, puis le mélange est laissé 15 minutes sur la glace. Ensuite, 450 µl de solution PCI (25:24:1 phénol : chloroforme : isoamyl alcohol saturé avec du Tris pH 7,9, 0,1% (p/v) hydroxyquinoline) sont mélangés en vortexant à nouveau pendant 30 secondes, puis le microtube est centrifugé pendant 15 minutes à 16 000 rpm. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube auquel est ajouté 450 µl d'isopropanol à température ambiante. Le tube est mélangé à l'aide du vortex pendant 30 secondes puis centrifugé 15 minutes à 16 000 rpm. Le surnageant est enlevé avec précaution et le culot est lavé avec 450 µl d'une solution d'éthanol (80 % (v/v)) conservée à -20°C. Le microtube est à nouveau centrifugé pendant 15 minutes à 16 000 rpm. Le culot est séché à l'air libre jusqu'à la disparition complète de traces d'éthanol, puis il est resuspendu dans 20 µl d'eau stérile. Ces purifications d'ADN plasmidique sont ensuite analysées par digestion à l'aide d'enzymes de restriction (voir section III-10) pour vérifier l'intégrité de la construction.

8- Préparation et transformation directe de bactéries compétentes *Agrobacterium rhizogenes*

Cette transformation directe d'*A. rhizogenes* de la souche A4 se fait par une méthode de congélation-décongélation (An *et al.*, 1988). On utilise 2 ml d'une pré-culture d'*A. rhizogenes* dans le milieu liquide MYA incubée à 28°C pendant 16 à 24h, pour inoculer une culture bactérienne de 50 ml de MYA qui servira pour la

transformation. Cette pré-culture a été inoculée à partir d'un stock glycérol conservé à -80°C . La croissance de la culture de 50 ml, sous agitation rapide (250 rpm) à 28°C , est suivie jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité optique à 600 nm comprise entre 0,5 et 1,0. La culture est alors refroidie sur la glace puis transférée dans un tube stérile de 50 ml de type Falcon. La suspension cellulaire est centrifugée à 3 200 rpm pendant 5 minutes, à 4°C . Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans 1,1 ml d'une solution stérile froide 20 mM de dichlorure de calcium (CaCl_2). Cette suspension cellulaire est alors distribuée en aliquotes de 100 μl dans des tubes stériles refroidis de 15 ml de type Falcon auxquels sont ajoutés 1 μg d'ADN plasmidique (correspondant aux différentes constructions choisies et vérifiées). Le mélange composé de cellules et d'ADN est équilibré pendant 10 minutes sur la glace avant d'être soumis à une congélation instantanée qui consiste à submerger les tubes de 15 ml dans l'azote liquide pendant 1 minute. Ensuite, les cellules sont dégelées pendant le choc thermique qui consiste à les incuber dans un bain-marie chauffé à 37°C pendant exactement 5 minutes. Puis 1 ml de milieu liquide MYA est ajouté aux cellules suivi d'une incubation à 28°C pendant 2 à 4 heures sous agitation lente (150 rpm). Cette période permet aux bactéries de récupérer des traitements précédents. Après cette incubation, les suspensions bactériennes sont transférées dans des microtubes de 1,5 ml pour faciliter la centrifugation d'une durée de 30 secondes. Les surnageants sont éliminés et les culots cellulaires sont repris dans 100 μl de milieu liquide MYA. Les cellules sont ensuite étalées sur des boîtes de culture contenant le milieu MYA solide additionné des antibiotiques kanamycine et tétracycline avec des concentrations respectives de 25 mg/l et 5 mg/l. Les boîtes de cultures sont incubées à 28°C dans le noir. Après 4 à 6 jours, les transformants apparaissent sur les boîtes et les colonies servent à inoculer des

précultures liquides de MYA. Une partie de ces dernières est stockée à -80°C dans du MYA contenant du glycérol 25% (v/v) et le reste est utilisé pour vérifier l'intégrité de la construction insérée dans la souche *A. rhizogenes* (voir section III-9).

9- Purification d'ADN plasmidique à partir de culture bactérienne *Agrobacterium rhizogenes*

Cette purification d'ADN plasmidique applique le protocole de An *et al.*, (1988) avec des modifications. Une pré-culture de milieu liquide MYA d'un volume de 1,4 ml contenant les antibiotiques kanamycine (25 mg/l) et tétracycline (5 mg/l) est inoculée avec la souche bactérienne *A. rhizogenes* contenant le vecteur pGA643 avec ou sans insert. La culture est incubée à 28°C pendant 24 à 40h sous agitation rapide (250 rpm), puis transférée dans des microtubes de 1,5 ml pour faciliter la centrifugation pendant 2 minutes à 4°C , à 10 000 rpm. Le surnageant est enlevé et les cellules sont resuspendues dans 100 μl de solution froide de lyse (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0, 50 mM glucose, 2mg/ml lysozyme), suivi d'une incubation à température ambiante pendant 10 minutes. Puis 200 μl de solution SDS alcaline fraîchement préparée (0,2 M NaOH, 1% (p/v) SDS) sont ajoutés à la suspension cellulaire qui est alors mélangée par inversion, puis incubée de nouveau à température ambiante pendant 10 minutes. Trente μl de phénol (équilibré avec du Tris pH 7,9, 0,1% (p/v) hydroxyquinoline) et 2 volumes de solution SDS alcaline sont ensuite ajoutés aux cellules qui sont vortexées à faible vitesse. Le mélange devient alors visqueux et 150 μl de sodium acétate 3M, pH 4,8 sont ajoutés. Les tubes sont mélangés rapidement par inversion, incubés à -20°C pendant 30 minutes et ensuite ils sont centrifugés pendant 3 minutes à 14 000 rpm à 4°C . Les

surnageants sont transférés dans de nouveaux microtubes de 1,5 ml, complétés avec de l'éthanol froid 95 % (v/v). Ils sont mélangés par inversion et incubés à -80°C pendant 30 minutes avant d'être à nouveau centrifugés pendant 15 minutes à 4°C , à 14 000 rpm. Les surnageants sont ensuite enlevés et les culots d'ADN précipité sont resuspendus dans 500 μl de sodium acétate 0,3 M, pH 7,0. Le volume des tubes est complété avec de l'éthanol froid 95% (v/v), puis ils sont mélangés par inversion avant d'être incubés à -80°C pendant 30 minutes ou -20°C toute la nuit. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C . Les surnageants sont éliminés et les culots d'ADN plasmidique sont lavés une première fois, avec de l'éthanol froid 70% (v/v), avant d'être centrifugés 5 minutes à 14 000 rpm. L'ADN précipité est lavé une deuxième fois avec de l'éthanol froid à 95% (v/v), centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions que précédemment puis les culots sont séchés à l'air libre afin d'éliminer l'éthanol jusqu'à une disparition complète. Le culot d'ADN plasmidique est dissout dans 20 μl d'une solution de Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) puis sera utilisé ultérieurement dans des analyses de digestions utilisant des enzymes de restriction, cela dans le but de vérifier l'intégrité des constructions insérées dans le plasmide pGA643.

10- Analyses de restrictions

Ces analyses ont été réalisées dans le but de vérifier l'intégrité des constructions qui ont été choisies et insérées dans le vecteur pGA643, c'est-à-dire vérifier le sens de l'insertion et la longueur de l'insert.

Nous avons utilisé des endonucléases de restriction de la compagnie Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Nous avons suivi les instructions du fournisseur quant aux quantités d'enzyme à utiliser par rapport à la quantité de plasmide à digérer. Nous avons utilisé le tampon de réaction propre à chaque enzyme qui l'accompagnait et dans le cas d'utilisation de plusieurs enzymes, nous avons choisi le tampon de réaction qui détenait les conditions optimales pour toutes les enzymes utilisées d'après les indications du fournisseur. Les réactions ont été incubées pendant une heure à 37°C. Nous avons également utilisé de la ribonucléase A à la concentration de 0,1 µg/µl dans les conditions conseillées par le fournisseur et cela sur l'ADN plasmidique issu des purifications décrites précédemment (voir sections III-7 et III-9).

11- Transformation de tiges de pomme de terre par *A. rhizogenes*

La transformation est réalisée sur des plants de pomme de terre *Solanum tuberosum* âgés entre 3 et 6 semaines qui ont poussé dans une chambre de croissance (Visser *et al.*, 1989). Cette transformation par *A. rhizogenes* donne naissance à la maladie des racines dites « chevelues ». Les plants sont défoliés à l'aide d'un scalpel et les plus jeunes tiges sont submergées dans un grand volume contenant une solution de javel commerciale à 10% (v/v) additionnée d'une goutte de Tween 20 par litre. A partir de cette étape, l'expérience est réalisée en conditions stériles. Les tiges, mélangées occasionnellement, sont désinfectées dans cette solution pendant 10 minutes, en prenant une attention particulière à leurs orientations. Les tiges sont ensuite rincées avec de l'eau déionisé stérile, toujours submergées et mélangées avec soin pendant 10 minutes également. L'étape de rinçage est répétée 2 fois afin d'éliminer d'éventuelles traces de

javel. Puis, sur du papier stérile de type whatman, les tiges sont recoupées à chaque extrémité pour générer des fragments d'une longueur comprise entre 3 et 4 centimètres. Ces fragments de tiges sont plantés dans un milieu de culture solide de type MS (Murashige et Skoog, 1962) contenant 0,4% (p/v) Phytigel et 3% (p/v) sucrose. Ils sont orientés de manière à ce que la partie apicale soit placée dans le milieu de culture. Les extrémités des fragments de tiges sont alors inoculées avec les cultures d'*A. rhizogenes* contenant le vecteur d'expression binaire pGA643 avec ou sans insert. Il est important que l'infection se fasse immédiatement après la blessure. Ces cultures ont été préparées 24h à l'avance sur des milieux solides MYA contenant les antibiotiques kanamycine (25 mg/ml) et tétracycline (5 mg/ml), à partir des stocks glycérolés, conservés à -80°C . Les pots de culture contenant les tiges infectées, sont incubés à $20-22^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'apparition de racines (entre 10 à 15 jours).

12- Sous-culture des clones racinaires

Après 10 jours, les racines transformées se développent de façon aérienne et apparaissent aux niveaux des sites d'infection sur les tiges de pomme de terre (figure III-4). Elles sont excisées et sous-cultivées sur un milieu solide de MS contenant 0,2% (p/v) Phytigel et 3% (p/v) sucrose. Elles sont sous-cultivées progressivement sur des milieux contenant des concentrations décroissantes de carbénicilline c'est-à-dire 500 mg/l, 200 mg/l puis 100 mg/l dans le but d'éliminer la bactérie *A. rhizogenes*. Puis l'antibiotique est totalement éliminé et les racines transformées sont sous-cultivées tous les mois sur du milieu MS solide (additionné de 0,2% (p/v) Phytigel et 3% (p/v) sucrose).

A.



B.



Figure III-4

A- Des plants de pomme de terre *Solanum tuberosum* âgés entre 3 et 6 semaines sont choisis pour la transformation par *Agrobacterium rhizogenes*.

B- Après 10 jours, les racines transformées se développent de façon aérienne et apparaissent aux niveaux des sites d'infection sur les tiges de pomme de terre, plantés dans un milieu de culture solide de type MS contenant 0,4% (p/v) Phytigel et 3% (p/v) sucrose.

13- Extraction totale de protéines et quantification

Entre 100 et 200 mg de racines cultivées sur boîte de pétri (voir section III-12), âgées entre 3 et 4 semaines ont été broyées dans un mortier afin d'extraire les protéines totales et de mesurer les activités phosphoenolpyruvate phosphatase (PEPase), pyruvate kinase (PK) et phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC). Ces racines ont été broyées sur la glace, dans une solution d'extraction contenant (30 mM acide 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonique (Hepes), 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 100 mM chlorure de potassium (KCl), 0,1% (v/v) Triton, 4% (p/v) polyéthylène glycol (PEG) 8000, 20% (v/v) glycérol, pH 7,5 ajusté avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) additionné de 5% (p/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), préparée la veille de l'expérience afin que ce dernier soit suffisamment hydraté (modifié de Smith *et al.*, 2000). Trois ml de tampon d'extraction étaient utilisés pour 1 g de tissu. Cinq mM dithiothreitol (DTT), 5 mM acide ε-amino-n-caproïque, 1 mM benzamidine et 2 mM phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF) étaient ajoutés juste avant l'extraction car ils sont instables en milieu aqueux. Après le broyage, 2 volumes de solution d'extraction sont ajoutés dans le mortier afin de récupérer la totalité des protéines. Le broyat de racines est centrifugé 15 minutes à 4°C, puis le surnageant est récupéré afin de mesurer les activités enzymatiques et la quantité totale de protéines présentes.

De plus, nous avons utilisé différents inhibiteurs de protéases lors d'extractions protéiques afin de limiter la dégradation de la PK, puis leurs effets ont été visualisés sur une membrane soumise à une immuno-détection (voir section III-15) par l'intermédiaire de l'anticorps anti-*Brassica napus* PKc. Ces inhibiteurs sont : 5 mM acide ε-amino-n-caproïque, 1 mM benzamidine, 2 mM phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF) qui sont

spécifiques aux protéases à sérine. Nous avons également utilisé 1mg/l leupeptine (spécifique aux protéases à cystéine), 1mg/l pepstatine (spécifique aux protéases à aspartate), 1 mM EGTA (spécifique aux métalloprotéases) ainsi que 5 μ M E64 et 10 μ M MG132 qui sont spécifiquement dirigés contre le protéasome.

La détermination de la concentration en protéines a été faite à l'aide d'une courbe de référence réalisée avec des concentrations connues de protéine standard, la sérum albumine bovine (BSA) et du réactif de Bradford (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) (Bradford, 1976). Les absorbances ont été lues à une densité optique de 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

14- Mesures enzymatiques *in vitro*

Toutes les mesures d'activité enzymatiques ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques VersaMax (Molecular Devices). Elles ont été réalisées à 340 nm à l'aide d'essais spectrophotométriques directs ou d'essais enzymatiques couplés. Toutes les mesures ont été faites dans un volume de 200 μ l et le lecteur de microplaque avait été préalablement calibré avec une solution standard de NADH.

14- 1. Pyruvate kinase (PK)

Le test enzymatique de la PK est couplé à l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) (Smith *et al.*, 2000). La réaction s'effectue à 30°C, en présence des substrats de la PK soit 2 mM phosphoenolpyruvate (PEP) et 1 mM adénosine diphosphate (ADP) en conditions saturantes, dans le tampon d'essai enzymatique composé de 50 mM Hepes,

5% (p/v) PEG, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, ajusté à pH 7,0 avec KOH. Les substrats sont consommés pour produire de l'ATP et du pyruvate. Ce dernier est consommé par la LDH (2 U/ml) en présence de 0,16 mM nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) pour donner du lactate et du nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée (NAD⁺). L'activité de la PK est mesurée en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm, dans la partie linéaire. Une mole de NADH consommée par la LDH correspond à une mole de pyruvate produite par une unité de PK en 1 minute à 30°C. Mais dans l'extrait brut de protéines, il existe une enzyme, la phosphoénolpyruvate phosphatase (PEPase) qui utilise un des substrats de la PK, le PEP. Par conséquent la disparition du NADH est due à la somme des activités PK et PEPase. Donc pour mesurer l'activité enzymatique PK, il est nécessaire de la corriger en soustrayant l'activité PEPase contaminante (voir section III-14-2) (figure III-5).

14- 2. Phosphoénolpyruvate phosphatase (PEPase)

La PEPase catalyse la réaction formant du pyruvate à partir du PEP. Son activité est mesurée dans les mêmes conditions que celle de la PK (voir section III-14-1) mais en omettant le substrat ADP dans la solution d'essai enzymatique.

14- 3. Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC)

La PEPC catalyse la β -carboxylation irréversible de PEP en présence d'ions bicarbonate (HCO₃⁻) et magnésium (Mg²⁺) pour former de l'oxaloacétate et du phosphate inorganique. L'essai enzymatique est couplé à l'enzyme malate

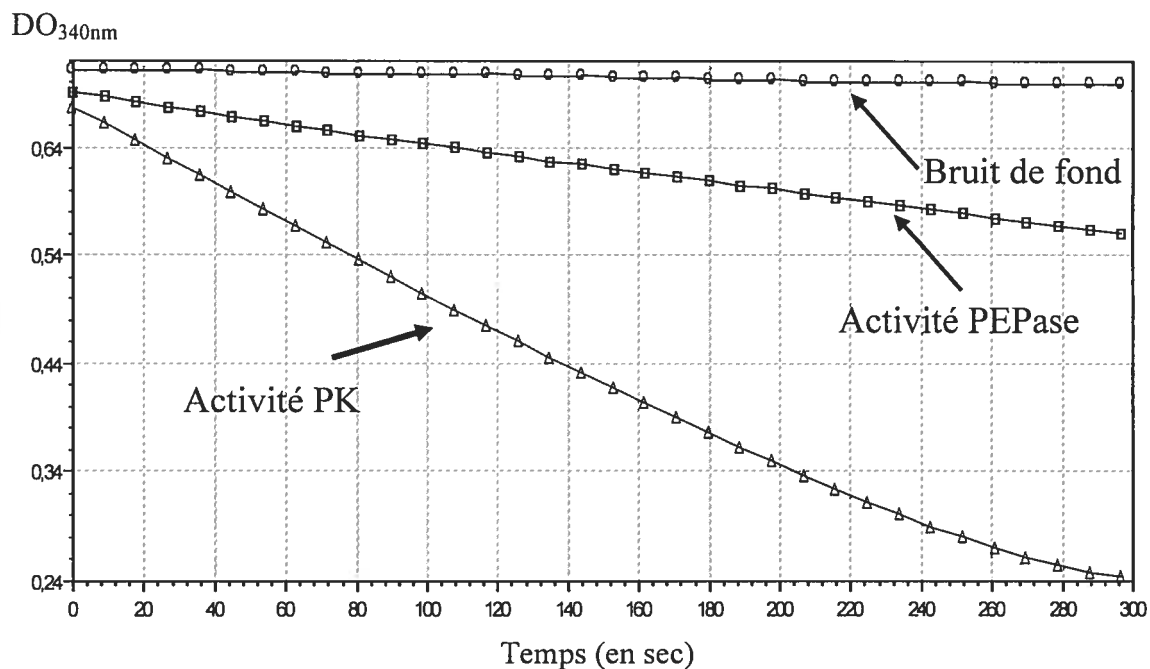


Figure III-5

Mesure des activités PK et PEPase à l'aide du logiciel Softmax Pro, qui permet d'analyser des données obtenues à l'aide du lecteur de microplaque VersaMax.

Les activités enzymatiques sont mesurées en suivant l'oxydation du composé NADH à une densité optique de 340 nm, à 30°C en utilisant un lecteur de plaque. Le logiciel calcule la pente dDo/dt et la valeur obtenue est transformée en nmoles de NADH consommées par minute, grâce à la calibration préalable de l'appareil avec une solution standard de NADH. Le même type de mesure est effectué pour tous les essais enzymatiques.

La mesure de l'activité PK est corrigée en soustrayant la mesure de l'activité contaminante de la PEPase.

déshydrogénase (MDH) et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm. Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM bistris-propane/HCl pH 8,4, 10% (v/v) glycérol, 2 mM PEP, 2,5 mM KHCO₃, 12 mM MgCl₂, 0,15 mM NADH et 5U/ml de MDH (Moraes et Plaxton, 2000).

14- 4. Pyruvate décarboxylase (PDC)

La PDC est instable à un pH supérieur à 7. Par contre, elle est très stable entre pH 6 et pH 7. Pour tester l'activité enzymatique de la PDC (Rivoal *et al.*, 1990), les racines ont donc été broyées à l'aide d'un mortier dans un tampon d'extraction composé de 50 mM acide 4-morpholine-ethanesulfonique (Mes)/NaOH, pH 6,2, 1 mM MgCl₂, 20% (v/v) glycérol, 1 mM thiamine diphosphate (TPP) et 5 mM DTT, additionné de 5% (p/v) PVP, 5 mM acide ε-amino-n-caproïque, 1 mM benzamidine, 5 mM DTT et 2 mM PMSF. Le broyage est suivi d'une centrifugation à 4°C pendant 15 minutes et l'activité est mesurée dans le surnageant.

La PDC catalyse la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde. L'essai enzymatique est couplé à l'alcool déshydrogénase (ADH) et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm. Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM Mes-NaOH, pH 6,2, 3,3 mM pyruvate, 0,12 mM NADH, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 mM TPP et 660 nkat/ml ADH de levure.

Pour les mesures d'activités enzymatiques suivantes, les racines ont été broyées dans le même tampon d'extraction que celui de la PK, PEPase et PEPC (voir section III-13) additionné de 1 mM acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-*N,N,N',N'*-

tétraacétique (EGTA) et 2 μM leupeptine. Ensuite le broyat de racines a été centrifugé pendant 15 minutes à 4°C puis le surnageant a été dessalé par un passage sur une colonne PD10 contenant Sephadex G25 (Amersham). L'équilibration de la colonne ainsi que l'élution de l'extrait protéique ont été réalisés avec une solution de dessalage de composition identique à celle du tampon d'extraction en omettant le PVP et le Triton-X-100. En fin d'expérience, les colonnes ont été régénérées avec 50 ml d'une solution 0,2% (p/v) azide de sodium. L'extrait élué a été dosé pour les mesures enzymatiques suivantes dans un volume réactionnel de 200 μl .

14- 5. Phosphofructokinase-ATP dépendante (PFK)

La PFK phosphoryle le fructose-6-phosphate, en présence d'ATP pour générer du fructose-1,6-diphosphate et de l'ADP. L'essai enzymatique est couplé à l'aldolase (ALD), à la triose phosphate isomérase (TPI) et à la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm (Wood *et al.*, 2002). Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM Bicine, pH 8,0, 5 mM MgCl_2 , 10 mM fructose-6-phosphate, 0,2 mM NADH, 0,25 mM ATP, 0,3 U/250 μl ALD, 0,3 U/250 μl G3PDH et 0,87 U/250 μl TPI. L'activité bruit de fond est obtenue en absence d'ATP dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec l'ATP pour obtenir l'activité PFK.

14- 6. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)

La FBPase déphosphoryle le fructose-1,6-diphosphate en fructose-6-phosphate en générant du phosphate inorganique. L'essai enzymatique est couplé avec la phosphoglucoisomérase (PGI) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et testé à 30°C en suivant la réduction du NAD à 340 nm (Wood *et al.*, 2002). Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM acide 1,4-piperazinediethanesulfonique (PIPES), pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM NAD, 50 µM fructose-1,6-diphosphate, 1 U/250 µl PGI, 0,5 U/250 µl G6PDH. L'activité bruit de fond est obtenue en absence de fructose-1,6-diphosphate dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec le fructose-1,6-diphosphate pour obtenir l'activité FBPase.

14- 7. Phosphofructokinase-pyrophosphate inorganique (PPi) dépendante (PFP)

La PFP phosphoryle le fructose-6-phosphate, en présence de PPi pour générer du fructose-1,6-diphosphate et du phosphate inorganique. L'essai enzymatique est couplé à l'aldolase (ALD), à la triose phosphate isomérase (TPI) et à la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm (modifié de Wood *et al.*, 2002). Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 10 mM fructose-6-phosphate, 0,3 mM NADH, 5 µM fructose-2,6-diphosphate, 2 mM NaPPi, 0,3 U/250 µl ALD, 0,3 U/250 µl G3PDH et 0,87 U/250 µl TPI. L'activité bruit de fond est obtenue en absence de NaPPi dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec le NaPPi pour obtenir l'activité PPi-PFP.

14- 8. Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase-NAD(P) dépendante (NAD(P)-GAPDH)

La GAPDH catalyse de manière réversible, l'oxydation et la phosphorylation du glyceraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate. L'essai enzymatique est couplé à la 3-phosphoglycerate kinase (PGK) et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NAD(P)H à 340 nm (Plaxton, 1990). Les conditions standards de l'essai sont : 100 mM Tris-HCl, pH 7,8, 8 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 4,5 mM 3-phosphoglycérate, 0,2 mM NAD(P)H, 2 mM ATP, 2 mM DTT et 1,8 U/ml PGK. L'activité bruit de fond est obtenue en absence de 3-phosphoglycérate dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec le 3-phosphoglycérate pour obtenir l'activité NAD(P)-GAPDH. Dans cet essai, la PGK produit le substrat de la réaction de la GAPDH, le 1,3-diphosphoglycérate. Il est important d'attendre 10 minutes avant l'essai pour permettre la production du substrat. D'autre part, la GAPDH doit être totalement réduite par le DTT avant la réaction, pour être totalement active.

14- 9. Triose phosphate isomérase (TPI)

La TPI catalyse le passage du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) au glyceraldéhyde-3-phosphate (GAP) de manière réversible. L'essai enzymatique est couplé à la G3PDH et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm (Dorion *et al.*, 2005). Les conditions standards de l'essai sont : 100 mM Tris-HCl, pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,2 mM NADH, 0,5 mM GAP et 2,5 U/ml G3PDH. L'activité bruit de fond est obtenue en absence de GAP dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec du GAP pour obtenir l'activité TPI.

14- 10. Aldolase (ALD)

L'aldolase catalyse l'interconversion du fructose-1,6-diphosphate en DHAP et GAP de manière réversible. L'essai enzymatique est couplé aux enzymes G3PDH et TPI et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm (Hodgson et Plaxton, 1998). Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0,1 mM fructose-1,6-diphosphate, 0,15 mM NADH, 10 U/ml TPI et 1 U/ml G3PDH. L'activité bruit de fond est obtenue en absence de fructose-1,6-diphosphate dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec le fructose-1,6-diphosphate pour obtenir l'activité ALD.

14- 11. Alcool déshydrogénase (ADH)

L'ADH catalyse l'interconversion de l'acétaldéhyde en éthanol, de manière réversible. L'essai enzymatique est testé à 30°C en suivant la réduction du NAD à 340 nm (Rivoal *et al.*, 1989). Les conditions standards de l'essai sont : glycine-NaOH 0,1 M, pH 9, 100 mM éthanol et 0,4 mM NAD. L'activité bruit de fond est obtenue en absence d'éthanol dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec l'éthanol pour obtenir l'activité ADH.

14- 12. Alanine aminotransférase (AAT)

L'AAT catalyse la transamination entre la L-alanine et le α -cétoglutarate pour former du pyruvate et du L-glutamate, cela de manière réversible. L'essai enzymatique est couplé à la LDH et testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm (Good et Crosby, 1989). Les conditions standards de l'essai sont : 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25

mM L-alanine, 5 mM α -cétoglutarate, 0,15 mM NADH et 5 U/ml LDH. L'activité bruit de fond est obtenue en absence d'alanine dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec de l'alanine pour obtenir l'activité AAT.

14- 13. Malate déshydrogénase-NAD(P) dépendante (NAD(P)-MDH)

La MDH catalyse l'interconversion réversible entre l'oxaloacétate (OAA) et le malate. L'essai enzymatique est testé à 30°C en suivant l'oxydation du NAD(P)H à 340 nm (modifié de Miller *et al.*, 1998). Les conditions standards de l'essai sont : 100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 25 mM DTT, 0,2 mM NAD(P)H et 3 mM OAA. L'activité bruit de fond est obtenue en absence d'OAA dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec de l'OAA pour obtenir l'activité NAD(P)-MDH.

14- 14. Isocitrate déshydrogénase-NAD(P) dépendante (NAD(P)-ICDH)

L'ICDH catalyse l'interconversion réversible entre l'isocitrate et α -cétoglutarate. L'essai enzymatique est testé à 30°C en suivant la réduction du NAD(P) à 340 nm (Jenner *et al.*, 2001). Les conditions standards de l'essai sont : 40 mM Tris-HCl, pH 7,6, 6,3 mM dichlorure de manganèse, 0,05% (v/v) Triton-X-100, 1,5 mM NAD(P) et 15 mM isocitrate. L'activité bruit de fond est obtenue en absence d'isocitrate dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec de l'isocitrate pour obtenir l'activité NAD(P)-ICDH.

14- 15. Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH catalyse l'interconversion réversible entre le pyruvate et le lactate. L'essai enzymatique est testé à 30°C en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm (modifié de Bouny et Saglio, 1996, Hoffman *et al.*, 1986). Les conditions standards de l'essai sont : 100 mM HEPES, pH 7,5, 2,3 mM pyrazole, 0,2 mM NADH et 12 mM pyruvate. L'activité bruit de fond est obtenue en absence de pyruvate dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec du pyruvate pour obtenir l'activité LDH.

14- 16. Glucokinase (GK) et Fructokinase (FK)

La GK et la FK catalysent la phosphorylation irréversible, dépendante d'ATP du glucose et du fructose respectivement. Les essais enzymatiques sont couplés à la G6PDH et testé à 30°C en suivant la réduction du NAD à 340 nm (modifié de Martinez-Barajas et Randall, 1998). Les conditions standards de l'essai sont : 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,3 mM NAD, 1 mM ATP, 1,4 U/ml G6PDH et soit 5 mM glucose pour l'essai GK, soit 6,75 U/ml de PGI et 5 mM fructose pour l'essai FK. L'activité bruit de fond est obtenue en absence d'hexose dans l'essai. Elle est soustraite à l'activité obtenue avec hexose pour obtenir l'activité HK.

15- Analyse de protéines de type western-blot

Les protéines extraites à partir des clones racinaires (voir section III-13) ont été soumises à une analyse de type western-blot c'est-à-dire une immuno-détection avec un anticorps polyclonal de lapin anti-*Brassica napus* PKc purifié par affinité contre la sous-unité PKc purifiée de *B.napus*. Cet anticorps a été généreusement donné par W.C

Plaxton, Queen's University, Ontario, Canada (Smith *et al.*, 2000). Cet anticorps ne reconnaît pas la PKp (Smith *et al.*, 2000 ; Rivoal *et al.*, 2002).

Les extraits protéiques sont dénaturés avant d'être soumis à une électrophorèse sur un gel dénaturant. Trois volumes d'extrait protéique sont additionnés à 1 volume de tampon d'échantillon (220 mM Tris-HCl pH 6,8, 36% (v/v) glycérol, 9% (p/v) SDS, 100 mM DTT et des traces de poudre de bleu de bromophénol) puis incubés à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ainsi dénaturés sont chargés sur un gel dénaturant composé d'un gel de séparation (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium (APS), acrylamide/bisacrylamide (12% / 0,32% p/v), 0,1% (p/v) SDS et 0,5 µl/ml N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)) et d'un gel de concentration (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,05% (p/v) APS, acrylamide/bisacrylamide (4%, 0,1% p/v), 0,1% (p/v) SDS et 1 µl/ml TEMED). Le gel migre dans du tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 200 mM glycine) additionné de 0,1% (p/v) SDS à 120V. Après un bref lavage dans une solution identique au tampon précédent, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF à l'aide d'un appareil d'électrotransfert (BIO-RAD) à 100V pendant 1h dans le tampon d'électrophorèse froid contenant 20% (v/v) méthanol. Puis après le transfert, la membrane est incubée pendant 1h sous agitation dans une solution de blocage (3% (p/v) lait en poudre dans un tampon « TBST » (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, 0,02% (p/v) azide de sodium)), suivie de 3 lavages de 10 minutes chacun dans le tampon « TBST ». La membrane est alors incubée à nouveau 1h avec un anticorps primaire anti-*Brassica napus* PKc, à des dilutions variables (entre 1/500 et 1/20) dans le tampon « TBST », additionné de 1% (p/v) BSA. La membrane est ensuite lavée à nouveau 3 fois 10 minutes dans le tampon « TBST » suivie d'une incubation de 1h avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin,

couplé à la phosphatase alcaline (Promega, Nepean, Ontario, Canada), dilué au 1/10 000 dans le tampon « TBST », additionné de 1% (p/v) BSA. La membrane est ainsi prête à être révélée, après avoir été rincée 3 fois 10 minutes dans le tampon « TBST ». La réaction est visualisée en incubant, 2 à 5 minutes, à température ambiante, la membrane dans la solution de détection (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, additionnée de 390 µg/ml nitrobleu de tetrazolium (NBT) et 90 µg/ml bromochlorylindolophosphate (BCIP)). La phosphatase alcaline, couplée à l'anticorps secondaire entraîne, par l'intermédiaire de BCIP, son substrat, un précipité coloré brun-violet du réactif NBT réduit.

16- Visualisation d'activité enzymatique par coloration sur gel natif de polyacrylamide

La méthode décrite ci-dessous permet de détecter des enzymes grâce à leur activité par coloration après migration d'un extrait brut de protéines sur un gel natif d'électrophorèse de polyacrylamide (Rivoal *et al.*, 2002). La coloration est basée sur un essai couplé à une enzyme ajoutée dans le gel après l'électrophorèse. Cette enzyme est liée à la disparition du NADH qui est facilement visible par fluorescence. Cette technique a été appliquée pour détecter les activités enzymatiques PK et PEPase.

Les protéines ont été extraites et mesurées dans les conditions décrites dans le paragraphe III-13. 40 µg de protéines, additionnées de bleu de bromophénol ont été chargés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide (III-15), sans SDS. Après une migration dans le tampon d'électrophorèse (décrit dans le paragraphe III-15, mais sans SDS) de 2 à 4h à 150V, à 4°C, le gel est incubé dans un tampon d'équilibration (50 mM

Hepes, 5% (p/v) PEG, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, ajusté à pH 7,0 avec KOH), pendant 15 minutes à température ambiante. Puis les pistes du gel sont découpées et incubées dans le tampon de développement désiré, soit pour la détection de l'activité PEPase (tampon d'équilibration additionné de 2 mM PEP, 0,15 mM NADH et 2 U/ml LDH), soit pour la détection de l'activité PK (tampon d'équilibration additionné de 1 mM ADP, 2 mM PEP, 0,15 mM NADH et 2 U/ml LDH). Un tampon de développement correspondant au bruit de fond est obtenu avec le tampon d'équilibration additionné de 0,15 mM NADH et 2 U/ml LDH. Le développement de la coloration se fait à température ambiante pendant 10 minutes et la visualisation des activités est réalisée à l'aide d'un transilluminateur à rayons ultra-violet. Les bandes d'activité correspondant aux sites d'oxydation du NADH, apparaissent sur le gel en bandes noires sur un fond fluorescent.

17- Mesures de croissance

Des boîtes de pétri ont été inoculées avec 1 apex racinaire de 0,7 cm de long. Sa croissance a été suivie au cours du temps avec le logiciel WinRhizo. On a mesuré la longueur totale du système racinaire en cm ainsi que le nombre d'apex racinaires par système racinaire au cours du temps. Les valeurs représentent 6 mesures indépendantes pour chaque clone et l'expérience a été répétée 3 fois.

IV- Résultats

1- ADN complémentaire de la PK

Pour réaliser ce projet, nous avons généré une population de racines de pomme de terre *Solanum tuberosum* avec des niveaux d'activité altérés pour l'activité PK. Pour la transformation, nous avons utilisé l'ADN complémentaire codant pour l'isoforme cytosolique de la PK de pomme de terre *Solanum tuberosum* (numéro d'accèsion : X53688), cultivar Kennebec (Blakeley *et al.*, 1990). La longueur totale de la séquence nucléotidique est de 2006 pb (figure III-1). La séquence qui a été déterminée correspond à ce qui a été publié. Ceci nous a permis de faire les constructions sens et antisens.

2- Constructions pour la transformation des pétioles de pomme de terre avec *Agrobacterium rhizogenes*

Pour moduler l'activité de la PK, nous avons transformé des pétioles de pomme de terre *Solanum tuberosum* avec un vecteur d'expression binaire pGA643 utilisant *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteur de transformation.

2- 1. Constructions en orientation sens

Deux constructions en orientation sens insérées dans le vecteur pGA643, dans le but d'augmenter l'activité PK dans les racines de pomme de terre générées après transformation, ont été choisies. Elles ont été appelées successivement S1 et S2 et sont décrites dans la partie « Matériel et Méthodes ». La transformation de bactéries compétentes *Escherichia coli* de type HB101 avec ces constructions a donné plusieurs

clones. Ils ont été analysés à plusieurs reprises, par digestions avec des enzymes de restriction. Pour la construction S1, nous avons testé en premier lieu 4 clones. Pour la construction S2, nous avons testé 10 clones. Au final, nous avons sélectionné deux clones bactériens pour chaque construction (tableau IV-1).

Après extraction d'ADN plasmidique, ces constructions ont été insérées dans le vecteur de transformation *Agrobacterium rhizogenes*. Après de multiples analyses avec des enzymes de restriction, 7 et 6 clones de *A. rhizogenes* portant respectivement à la construction S1 et S2, ont été sélectionnés afin d'être utilisés pour la transformation de pétioles de pomme de terre.

2- 2. Constructions en orientation antisens

Quatre constructions avec une orientation antisens ont été choisies dans le but de diminuer l'activité PK dans les racines de pomme de terre. Elles ont été nommées successivement AS1, AS2, AS3, AS4 et sont décrites dans la partie « Matériel et Méthodes ». La procédure a été similaire à celle des constructions en orientation sens. Après transformation des bactéries compétentes *Escherichia coli* de type HB101, nous avons obtenu respectivement 6, 3 et 3 clones positifs pour les constructions AS1, AS2 et AS4. Aucun clone positif n'a pu être généré pour la construction nommée AS3 (tableau IV-1). La transformation d'*Agrobacterium rhizogenes* a été réalisée avec 12 clones au total. Après de multiples analyses avec des enzymes de restriction, 12, 6 et 8 clones, correspondant respectivement aux constructions AS1, AS2 et AS4, ont été sélectionnés afin d'être utilisés par la suite, pour la transformation de pétioles de pomme de terre.

Constructions	Clones positifs dans <i>E.Coli</i>	Clones positifs dans <i>A.rhizogenes</i>	Clones racinaires générés	Population finale
Cl		3	34	3
AS1	6	12	94	5
AS2	3	6	41	1
AS3	0	/	/	/
AS4	3	8	38	2
S1	2	7	68	3
S2	2	6	99	11
Total	16	42	374	25

Tableau IV-1

Récapitulatif des clones obtenus et sélectionnés après chaque étape de transformation.

Cl : lignée contrôle

AS : lignée transformée avec une construction antisens

S : lignée transformée avec une construction sens

2- 3. Construction contrôle

Nous avons également généré une construction qui a servi de contrôle dans la suite des expériences. Celle-ci était constituée uniquement du vecteur d'expression binaire pGA643, c'est-à-dire un vecteur vide. Elle a servi de référence pour observer l'influence de l'insertion des constructions sens et antisens sur le métabolisme des racines transformées et a permis d'éliminer un éventuel artefact dû uniquement à l'insertion du vecteur. Nous avons transformé *Agrobacterium rhizogenes* avec l'ADN plasmidique et choisi 3 clones nommés Cl.

3- Transformations de pétioles de pomme de terre avec *Agrobacterium rhizogenes*

Des pétioles de pomme de terre ont été transformés avec *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteur de transformation. Au total, nous avons 42 lignées d'*A. rhizogenes* que nous avons utilisées pour la transformation, représentant 6 constructions différentes. Nous avons généré un peu moins de 400 clones racinaires à la suite de 4 séries de transformation, afin de couvrir l'ensemble des clones que nous avons sélectionnés dans *A. rhizogenes* (tableau IV-1).

4- Criblage des clones racinaires générés après transformation

Comme il a été mentionné dans l'introduction, le but de ce projet de maîtrise était de générer une population d'individus racinaires avec des niveaux d'activité enzymatique PK altérés par rapport à un clone racinaire contrôle. Cela veut dire que nous voulions avoir des individus ayant une gamme d'activités PK très large allant du

plus bas au plus haut niveau d'activité qu'il puisse exister dans le métabolisme racinaire de pomme de terre.

4- 1. Mesures de l'activité enzymatique totale de la pyruvate kinase dans des extraits totaux de protéines

Nous avons mesuré l'activité totale PK dans les clones racinaires générés. A la suite d'un premier criblage enzymatique sur 110 clones, nous avons sélectionné 64 individus potentiellement intéressants, avec des activités PK différentes par rapport aux clones contrôles. Les mesures ont été répétées de nombreuses fois et cela nous a permis de sélectionner une population finale de 25 clones (figure IV-1). Elle était constituée de 3 individus contrôles (Cl 1, 2 et 3) permettant d'obtenir une valeur moyenne d'activité PK qui sert de référence ; de 8 individus, nommés AS, qui montraient une activité PK inférieure à celle mesurée dans les clones contrôles et de 14 clones, nommés S, avec une activité supérieure à la valeur moyenne des contrôles. L'activité de chaque individu est une moyenne d'au moins 5 extractions indépendantes effectuées chacune en triplicata. La valeur moyenne de l'activité totale PK dans les racines contrôles de pomme de terre est de 0,302 unités par mg de protéines avec une erreur standard de plus ou moins 4%. L'activité totale de PK de la population des 22 clones est comprise entre 55 et 123 % par rapport à l'activité totale moyenne de PK mesurée dans les plants contrôles.

Activité PK
 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg prot.}$

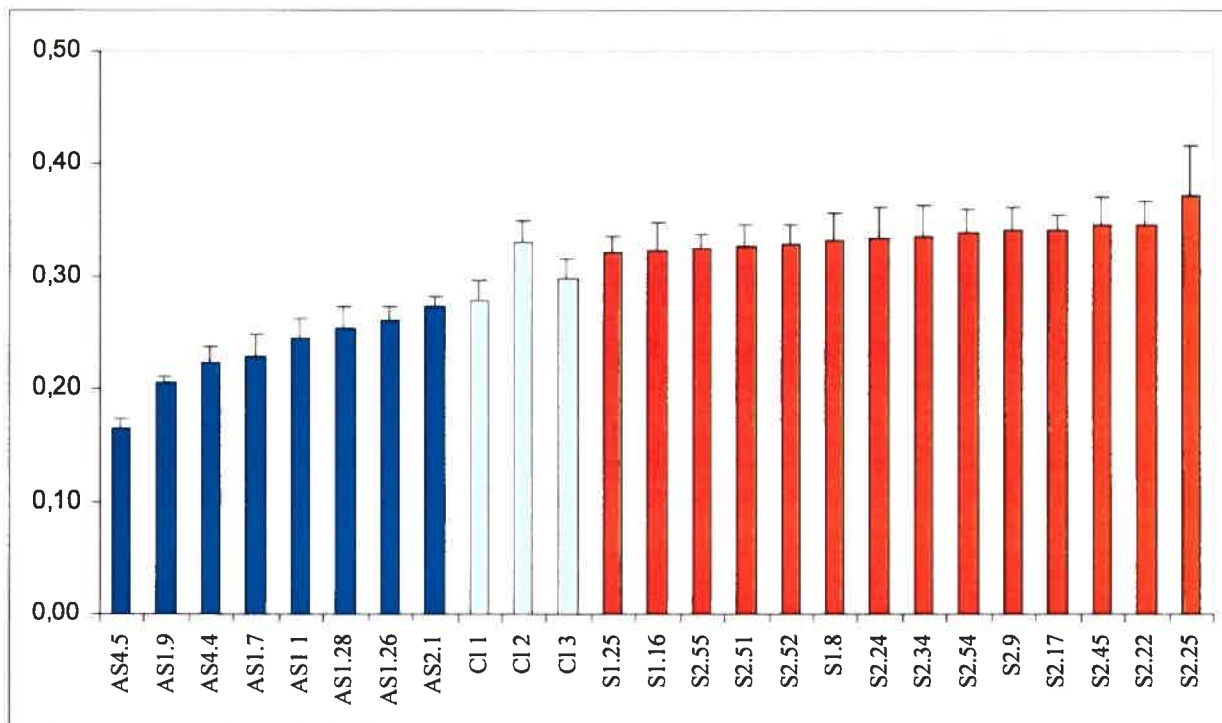


Figure IV-1

Population sélectionnée de racines de pomme de terre transgéniques sur (S) et sous (AS) exprimant la PKc par rapport à des racines contrôles (CI).

Plus précisément, pour les individus AS, leur activité est comprise entre 55 et 90 % par rapport à la valeur moyenne et entre 106 et 123 % pour les individus S. Il est à noter que les activités PK des individus sens, lorsque l'on regarde les erreurs standards (figure IV-1), ne sont pas significativement plus élevées que celle des contrôles. Par contre certains individus antisens ont une activité significativement plus faible que les contrôles.

4- 2. Étude de la dégradation protéolytique de la protéine pyruvate kinase

Lors d'analyses préliminaires sur le niveau d'expression des protéines PK à l'aide de la technique western-blot, nous avons pu remarquer que la protéine PK était sujette à une dégradation protéolytique. A plusieurs reprises, de multiples bandes avec des masses moléculaires inférieures à 50 kDa ont été observées par western-blot. Cette dégradation pourrait advenir *in vitro*, mais aussi *in vivo*. En effet, Tang *et al.*, (2003) ont démontré une dégradation de la PK par la voie de l'ubiquitine. Cette dégradation pourrait se produire *in vitro*, lors de l'extraction (Tang *et al.*, 2003) et donc constituer un artefact d'extraction. Dans ce cas, la dégradation serait due à la mise en contact de la PK avec des protéases lors de l'extraction des tissus. Afin d'évaluer cette dernière possibilité, nous avons extrait la PK en présence d'inhibiteurs de protéases. Donc, dans le but d'identifier et de contrôler cette protéolyse, nos analyses de type western-blot ont été effectuées en présence de différents inhibiteurs de protéases, afin de déterminer lesquels d'entre eux avaient le meilleur impact et donc assureraient la meilleur défense de la protéine PK face à la dégradation.

Cette expérience a été réalisée sur le clone racinaire contrôle Cl 2 qui a été broyé sur la glace en présence d'inhibiteurs de protéases, comme décrits dans la figure IV-2. L'échantillon a été broyé en moyenne 5 minutes, avant d'être centrifugé puis le surnageant a été dénaturé 5 minutes à 95°C dans un tampon de dénaturation. Les échantillons ont été chargés sur un gel dénaturant puis soumis à une immunodétection avec l'anticorps anti-*Brassica napus* PKc. Cette immunodétection a été réalisée avec des anticorps purifiés par affinité, donc de manière très spécifique.

La figure IV-2 montre un patron de bandes qui correspond à 2 bandes de fortes intensités à un poids moléculaire approximatif de 55 et 56 kDa ainsi qu'à des bandes de poids moléculaires plus faibles. Les bandes à 55 et 56 kDa pourraient correspondre au poids moléculaire attendu pour des sous-unités PKc intactes. Les bandes de plus petites tailles correspondent à des peptides dont l'intensité varie en fonction des traitements et pourraient correspondre à des produits de dégradation protéolytique. Il semblerait que la dégradation des sous-unités PK soit diminuée en présence d'inhibiteurs contre des protéases à cystéine, en particulier la leupeptine et E64 (membrane A, pistes 3 et 6 et membrane B, piste 4) et également en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132 (membrane B, piste 2).

4- 3. Etude de stabilité des activités PK et PEPase en fonction du temps

Pour évaluer les effets de la possible dégradation de la PK dans les essais enzymatiques, nous avons réalisé des expériences contrôle dans lesquelles les activités PK et PEPase étaient extraites, puis laissées sur la glace avant d'être mesurées à

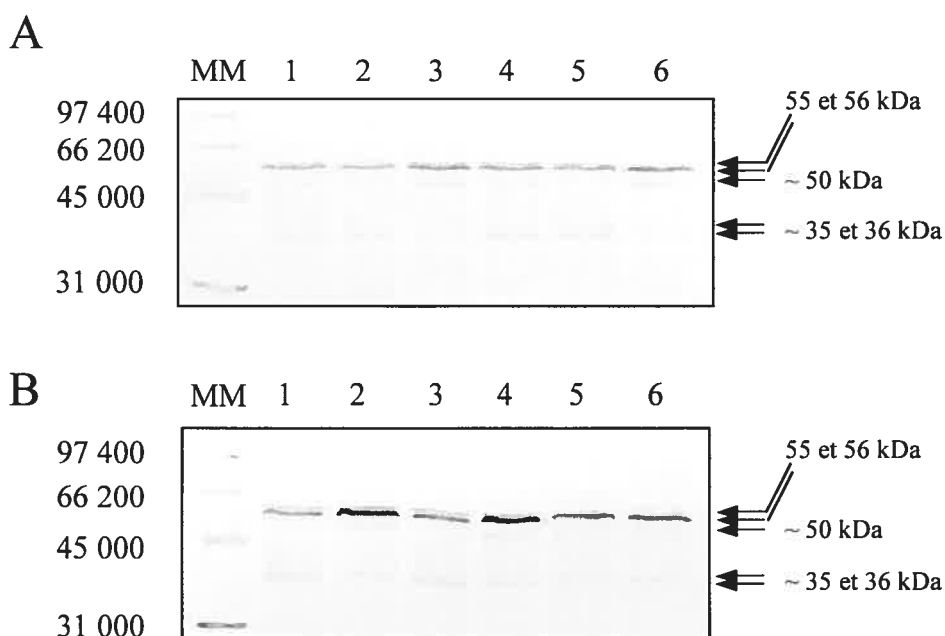


Figure IV-2

Immunodétection avec des IgG purifiés par affinité anti-PKc *Brassica napus*, sur un gel dénaturant d'un extrait brut de protéines d'un clone racinaire contrôle, soumis à différents inhibiteurs et mélanges d'inhibiteurs.

Membrane A

Piste 1 : Aucun inhibiteur

Piste 2 : Inhibiteurs dirigés contre des protéases à sérine : benzamidine 1mM, acide - amino-n-caproïque 5 mM, PMSF 2mM

Piste 3 : Inhibiteur dirigé contre des protéases à cystéine : leupeptine 1mg/l

Piste 4 : Inhibiteur dirigé contre des protéases à aspartate : pepstatine 1mg/l

Piste 5 : Inhibiteur dirigé contre des métalloprotéases : EGTA 1 mM

Piste 6 : Mélange de benzamidine 1mM, acide - amino-n-caproïque 5 mM, PMSF 2mM, leupeptine 1mg/l, pepstatine 1mg/l, EGTA 1 mM

Membrane B

Piste 1 : Aucun inhibiteur

Piste 2 : Inhibiteur dirigé contre le protéasome : MG132 10µM dilué dans DMSO

Piste 3 : DMSO

Piste 4 : Inhibiteur dirigé contre des protéases à cystéine : E64 5µM

Piste 5 : Idem piste 6, membrane A

Piste 6 : Idem piste 6, membrane A, ajouté de E64 5µM, MG132 10µM

différents intervalles de temps sur une durée de 6h30. Nous avons utilisé 3 clones racinaires : un contrôle (Cl 3), un antisens (AS4.5) et un sens (S2.22) (Figure IV-3).

Nous n'avons pas observé de variations majeures lors de cette expérience, ce qui montre par conséquent que le temps de stockage n'a pas d'influence significative sur l'activité PK.

4- 4. Activité pyruvate kinase sur gel natif

Les mesures d'activité enzymatique PK par dosages spectrophotométriques reflètent l'activité PK totale. Il existe plusieurs isoformes, dont l'une (PK_p) ne devrait pas être affectée par la transgénése. Il était important de confirmer les mesures d'activité par d'autres techniques. Nous avons d'abord utilisé l'analyse par gel natif. Cette méthode est basée sur une coloration d'activité enzymatique sur un gel de polyacrylamide (Rivoal *et al.*, 2002). Cette technique est spécifique car elle est basée sur la même réaction enzymatique que celle utilisée au spectrophotomètre. Cette expérience consiste à charger des extraits protéiques sur un gel natif qui est mis en contact avec le tampon d'essai enzymatique après migration. Deux essais ont été réalisés sur 3 clones racinaires (AS4.5, S2.25 et Cl 3), le premier pour l'activité PEPase et le deuxième pour l'activité PK. En effet, comme c'est le cas pour les tests spectrophotométriques, il est nécessaire de soustraire à l'activité PK, le bruit de fond correspondant à l'activité PEPase. En effet, ces 2 enzymes utilisent un substrat en commun le PEP et par conséquent 2 tests ont été réalisés en parallèle (figure IV-4). Sur le gel spécifique à la coloration de l'activité PK, on observe 2 bandes supplémentaires (bandes 3 et 4). Malgré que l'expérience ait été répétée plusieurs fois, les résultats ne sont pas concluants car la

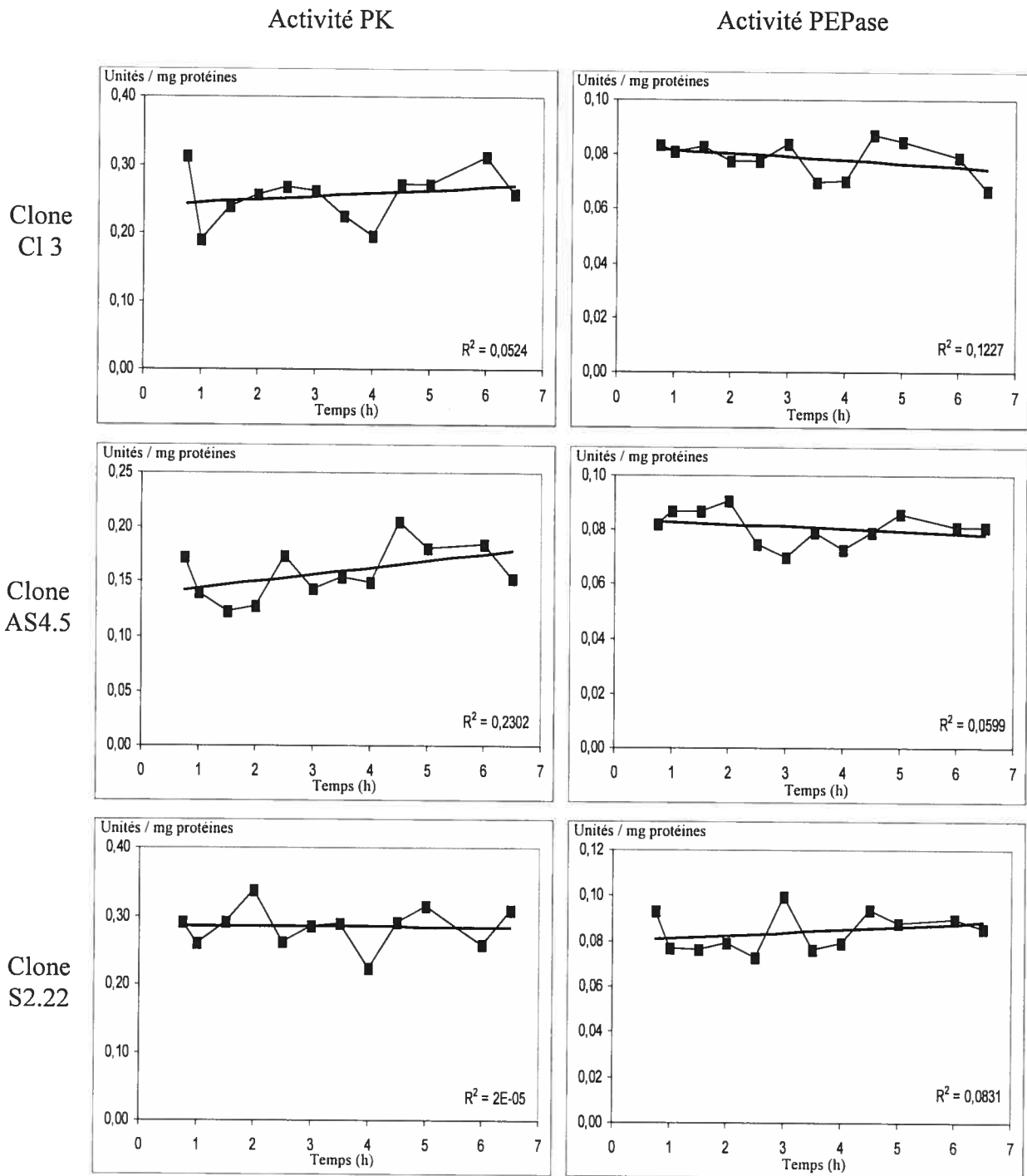


Figure IV-3

Courbes de stabilité des activités PK et PEPase en fonction du temps.
 Les activités sont exprimées en unités par mg de protéines. Pour l'ensemble des clones, la quantité de protéines par essai était approximativement du même ordre de grandeur.

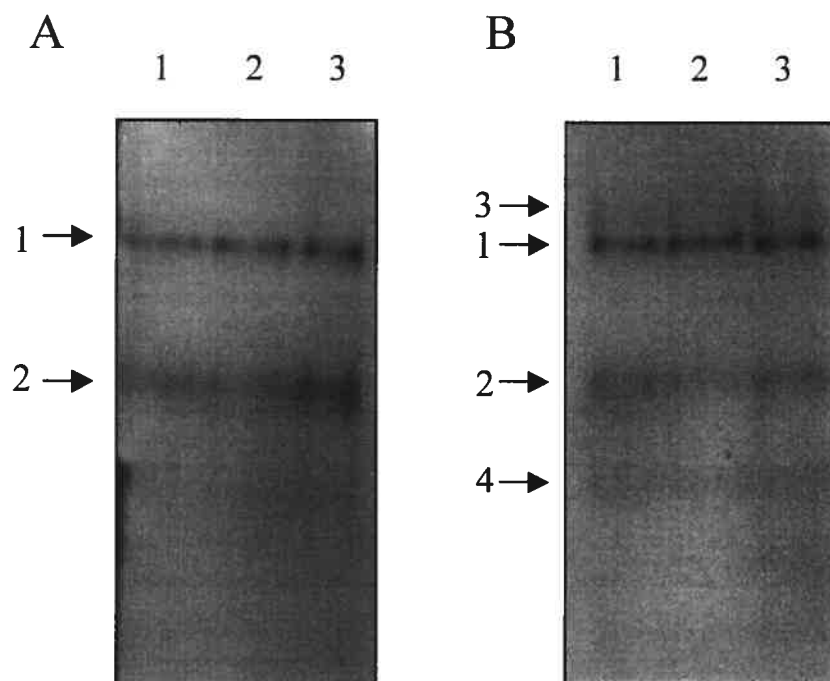


Figure IV- 4

Colorations d'activités enzymatiques spécifiques sur gels natifs de polyacrylamide déterminées pour 3 clones racinaires (piste 1: AS4.5; piste 2: Cl 3; piste 3: S2.25)

A- Activité PEPase (sans ADP)

B- Activité PK (avec ADP)

Bandes 1 et 2 : Bruit de fond correspondant à l'activité PEPase

Bandes 3 et 4 : Bandes détectées lors de la coloration spécifique de l'activité PK

PK n'apparaît pas clairement. Nous avons donc tenté de confirmer que la bande 3 ou 4 correspondait à la PK en faisant une analyse bidimensionnelle (native/SDS-PAGE) suivie d'une immunodétection (figure IV-5). Ceci permet de localiser la PK à l'intérieur du gel natif et de montrer que la PK ne forme pas une bande bien définie dans le gel natif. La réaction avec l'anticorps PK s'étale sur plusieurs centimètres et ceci pourrait rendre difficile la détection par coloration d'activité. Il est également possible que l'activité PK ne soit pas maintenue dans nos conditions. Par contre, il est clair qu'aucune bande immunoréactive ne peut être détectée dans le bas du gel natif.

4- 5. Visualisation de la quantité de protéines PKc par analyse de type western-blot

Nous avons voulu corréler les niveaux d'activité PK aux niveaux d'expressions protéiques PKc sur la population de clones sélectionnés à la suite des mesures spectrophotométriques d'activité enzymatique de la PK totale (figure IV-1). Nous avons fait des analyses de type western-blot avec l'anticorps anti-*Brassica napus* PKc. Pour extraire les protéines, nous avons utilisé 2 tampons d'extraction décrits dans la partie « Matériel et Méthodes ».

Dans un premier temps, les clones ont été extraits dans le tampon ayant servi à la mesure d'activité. Les extraits ont ensuite été analysés par gel natif, suivi d'un transfert et d'une immunodétection. Pour des raisons pratiques, seule une partie de la population a été analysée (figure IV-6). Dans tous les extraits, une seule bande est détectée sur la membrane. Cette bande migre à une position similaire à la bande 3 (figure IV-4) et traîne vers le haut du gel d'une façon identique à ce qui a été détecté lors de l'analyse

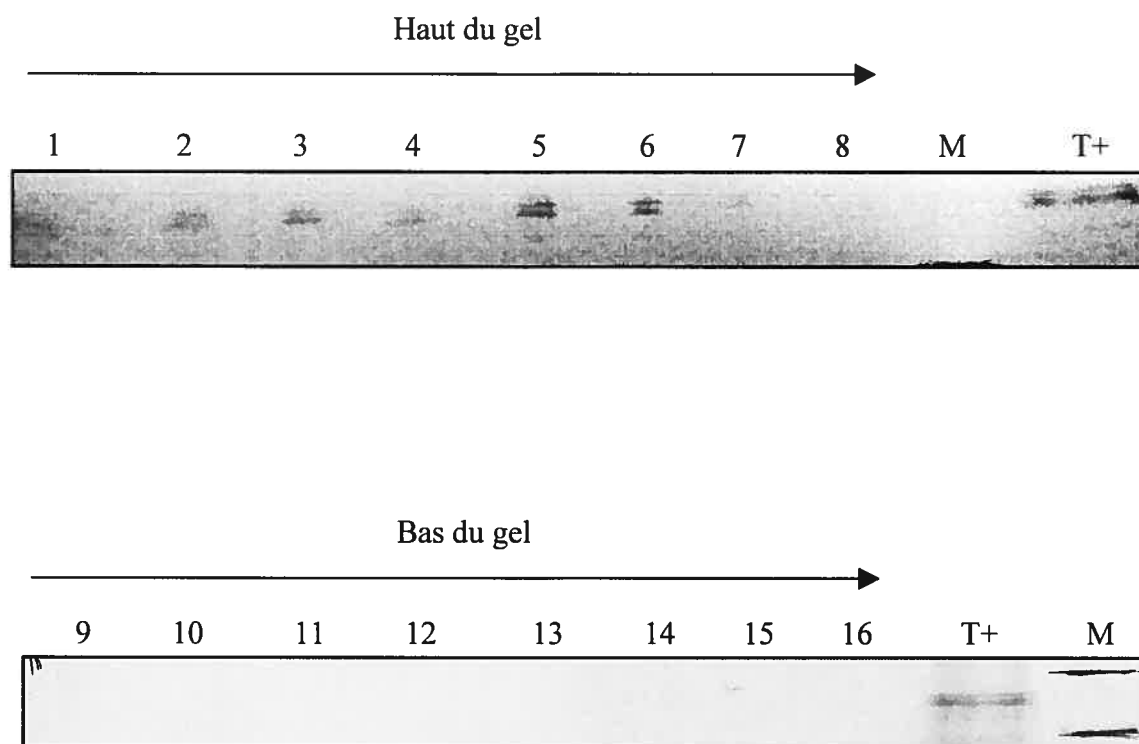


Figure IV-5

Analyse 2D (natif/SDS-PAGE) de la PK dans un extrait de clone contrôle (Cl 3). Après migration, le gel natif à 8% a été découpé en 16 tranches égales qui ont été migrées sur un gel SDS, transféré et soumis à une analyse western-blot avec l'anticorps anti-*Brassica napus* PKc.

Les puits numérotés de 1 à 8 correspondent à la partie du gel dans lequel se trouvent les bandes désignées de 1 à 3 sur le gel natif de la figure IV-4.

Les puits numérotés de 9 à 16 correspondent à la partie du gel dans lequel se trouve la bande 4 sur le gel natif de la figure IV-4.

M : Marqueurs

T+ : témoin positif correspondant à un extrait protéique de racines transgéniques broyées

AS4.5 AS1.9 AS4.4 AS1.7 Cl 1 Cl 2 S2.17 S2.45 S2.22 S2.25

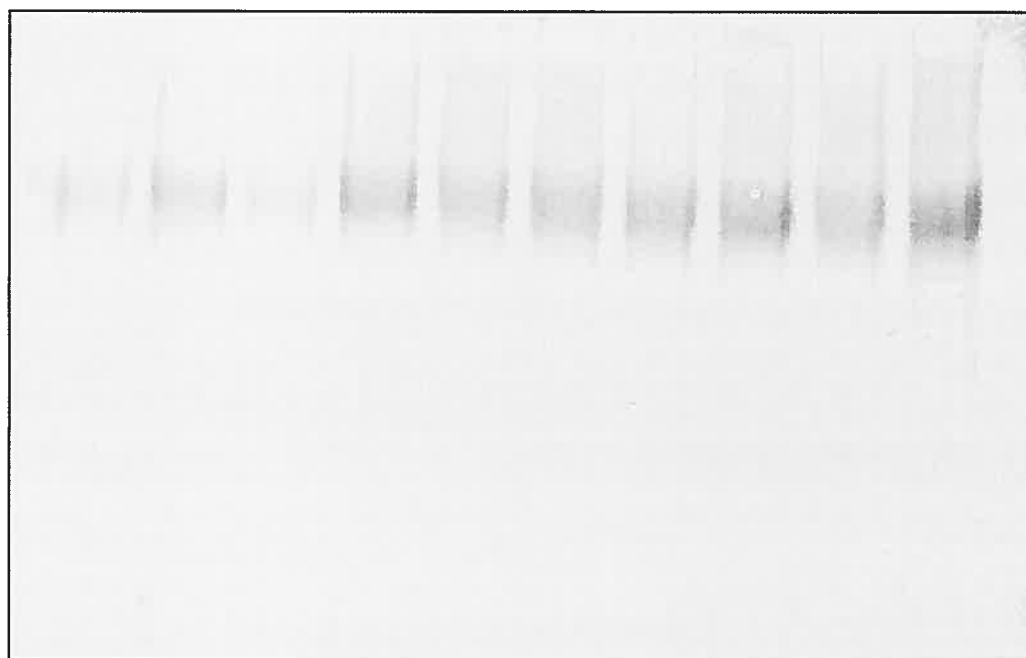


Figure IV-6

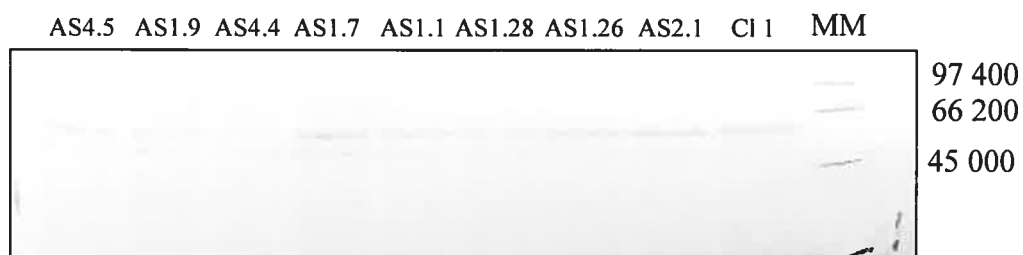
Analyse sur gel natif à 8% de clones antisens, contrôles et sens, extraits dans le tampon ayant servi à la mesure d'activité.

Pour chaque clone, la même quantité de protéines ($32 \mu\text{g}$) a été chargée sur le gel, qui après migration a été transféré puis soumis à une analyse western-blot avec l'anticorps anti-*Brassica napus* PKc.

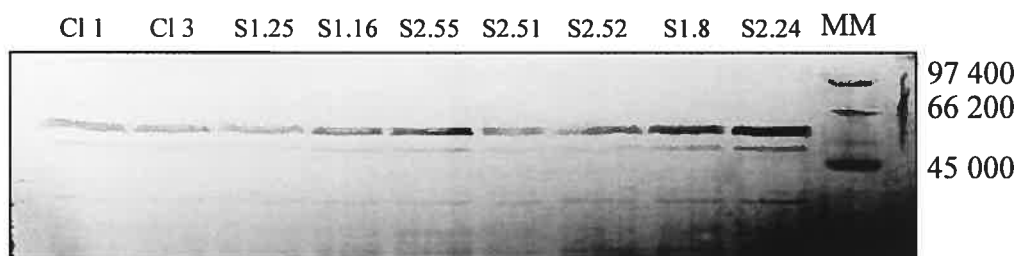
2D (natif/SDS-PAGE) dans la figure IV-5. Malgré l'aspect diffus des bandes, les résultats indiquent une diminution du signal reconnu par les anticorps dans les clones AS4.4 et AS4.5. Il y a peu de différences clairement détectables entre tous les autres clones.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'extraction des clones dans l'acide trichloroacétique (TCA), un dénaturant puissant pour inhiber les protéases. Nous avons utilisé une solution d'extraction de TCA 10% (p/v) suite aux résultats précédents démontrant une protéolyse partielle de la PKc dans les extraits (figure IV-7). Suite à l'immunodétection, nous avons 2 bandes de fortes intensités proches du poids de 55-56 kDa et un profil de bandes avec des poids moléculaires plus faibles. Dans cette expérience, il faut comparer les profils et les intensités de bandes obtenus avec les clones sens et antisens, avec les clones contrôles présents sur la même membrane car il y a des différences d'intensité de coloration entre les 3 différentes membranes. Les différences d'intensité d'un gel à l'autre peuvent aussi provenir d'une efficacité de transfert différente d'un appareil à l'autre que nous ne contrôlons malheureusement pas. Étant donné que l'extraction a été faite en présence de TCA, ces données supportent l'hypothèse que la dégradation de la PKc se passe au moins partiellement *in vivo*. Il apparaît que des clones antisens ont un niveau d'expression plus faible que celui du clone contrôle Cl 1, mais ceci est plus marqué pour les clones AS4.5 et AS4.4 qui donnent encore un signal plus faible par rapport aux autres transgéniques antisens. Quant aux niveaux d'expressions des clones sens, il n'y a pas d'augmentation d'intensité détectable par rapport aux contrôles (Cl 1, Cl 1 et Cl 3), ce qui confirme les résultats obtenus par mesures spectrophotométriques des activités (figure IV-1).

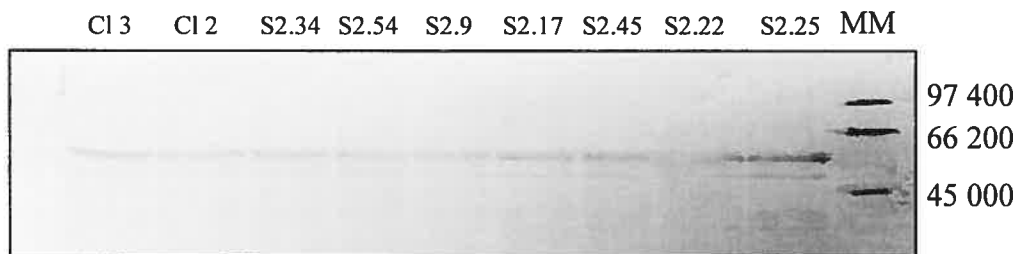
Clones Antisens, sous exprimant PK



Clones Sens, sur exprimant PK



Clones Sens, sur exprimant PK

**Figure IV-7**

Immunodétection réalisée avec un anticorps purifié par affinité anti-*B.napus* PKc, sur des préparations de protéines extraites dans une solution d'acide trichloroacétique 10%

CI : racines contrôles

MM : masse moléculaire en daltons

5- Caractérisation de l'activité des enzymes glycolytiques chez les lignées transgéniques

Il arrive parfois qu'une modification opérée par transgénèse aie des effets pléiotropiques sur d'autres enzymes du métabolisme. Nous devons donc caractériser les niveaux des autres enzymes de la voie glycolytique. Nous voulions en particulier savoir si les modifications éventuellement observées dans la suite du projet étaient directement reliées à l'insertion du transgène PK ou à une autre enzyme qui aurait vu son activité modifiée.

Les activités PEPC, PK et PEPase se partagent le PEP dans la glycolyse. Elles ont été mesurées sur tous les clones. Les valeurs PEPase et PEPC sont des moyennes de 3 mesures indépendantes, réalisées chacune en triplicata. Il est donc possible d'exprimer l'activité PK en fonction soit de la PEPC (figure IV-8) soit de la PEPase (figure IV-9). On observe une modeste corrélation positive entre le niveau de la PK et chacune des 2 autres enzymes. Ceci est plus marqué dans le cas de la corrélation PK/PEPC.

Nous avons également mesuré les activités de 17 autres enzymes de la glycolyse afin de déterminer si la présence du transgène avait affecté de façon significative d'autres étapes de la voie glycolytique (tableaux IV-2 et IV-3). Pour des raisons pratiques, cette expérience a été réalisée sur 2 clones contrôles, ainsi que 4 clones exprimant les 2 plus fortes et les 2 plus faibles activités enzymatiques PK, soit respectivement, S2.22, S2.25 et AS4.5, AS1.9. Chaque valeur d'activité enzymatique est une moyenne de 3 mesures indépendantes, réalisées chacune en triplicata. De plus, elles ont également été vérifiées avec les données de la littérature et elles se trouvent dans le

Activité PEPC
Unités par mg prot.

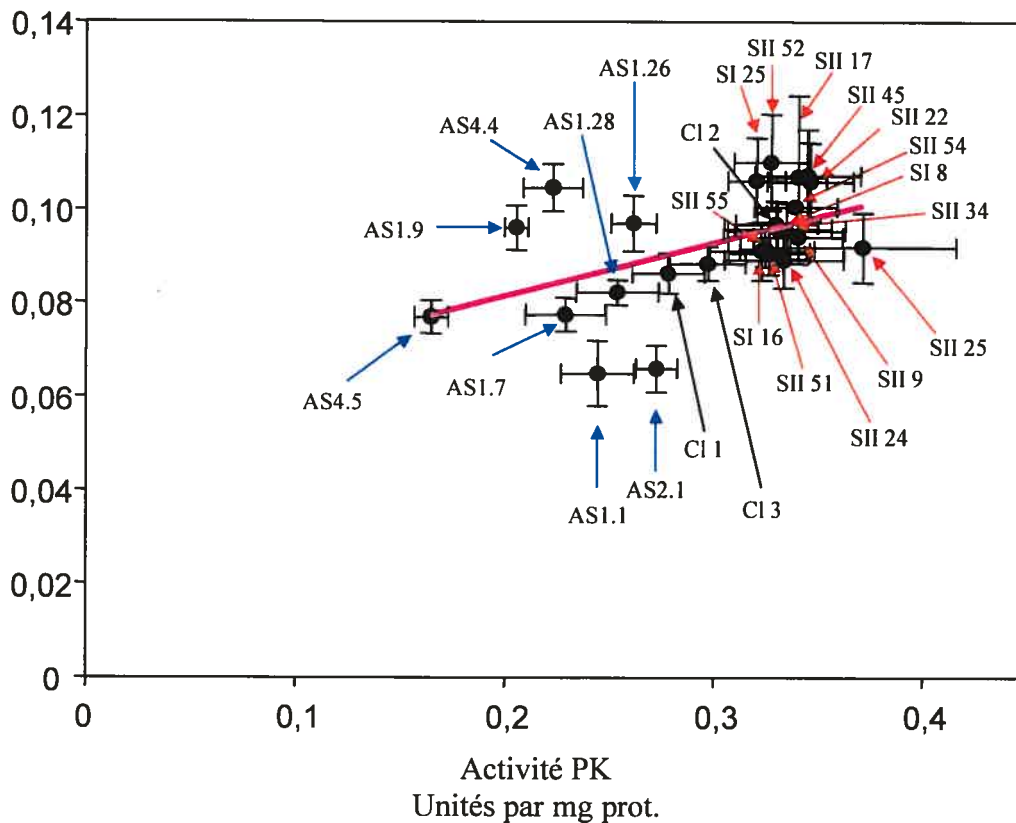


Figure IV-8

Corrélation entre les activités PK et PEPC.

Les activités sont représentées en unités par milligramme de protéines.

Le coefficient de corrélation est égale à 0,239.

Les clones contrôles, sens et antisens sont respectivement identifiés par des flèches noires, rouges et bleues.

Activité PEPase
Unités par mg prot.

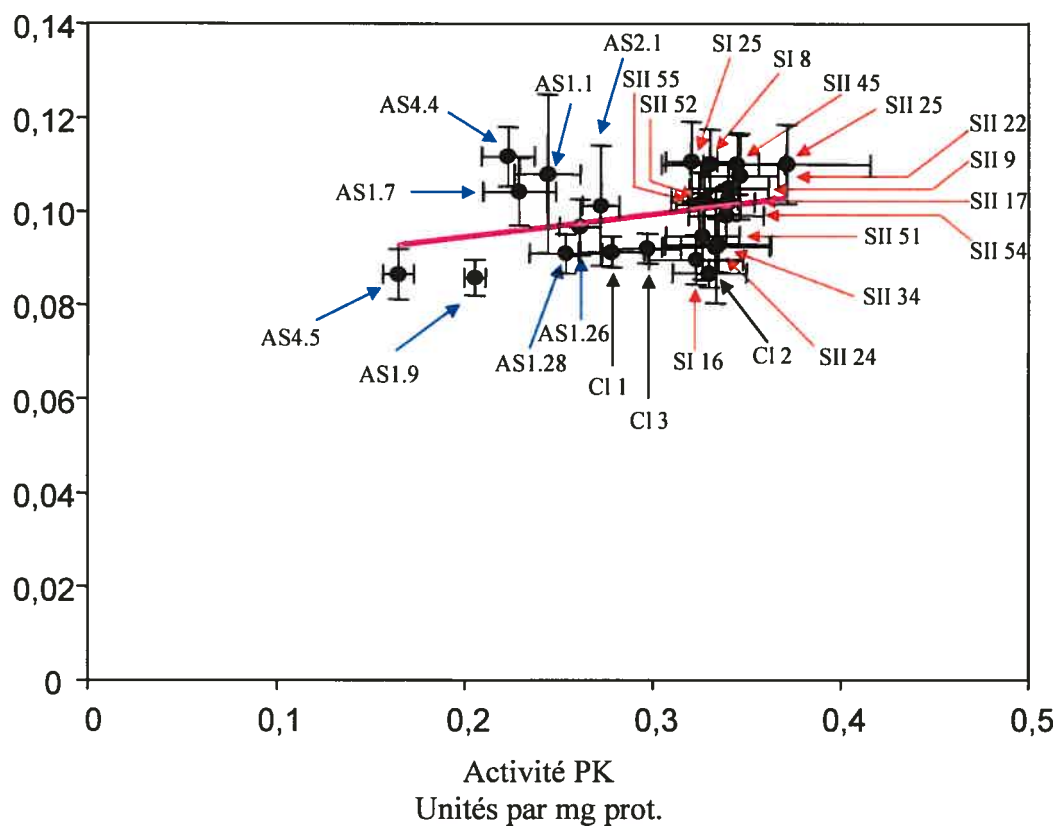


Figure IV-9

Corrélation entre les activités PK et PEPase.

Les activités sont représentées en unités par milligramme de protéines.

Le coefficient de corrélation est égale à 0,093.

Les clones contrôles, sens et antisens sont respectivement identifiés par des flèches noires, rouges et bleues.

	Clone AS4 5		Clone AS1 9		Clones contrôles Activité moyenne \square en Unités/mg prot.
	Activité* en % par rapport à l'act. du contrôle	Erreur Standard en %	Activité* en % par rapport à l'act. du contrôle	Erreur Standard en %	
PDC	96	12	83	18	0,099
PFK	76	9	93	7	0,058
FBPase	92	9	72	2	0,016
PFK	91	7	90	6	0,221
NAD-GAPDH	100	6	110	5	1,088
NADP-GAPDH	126	8	95	9	0,008
TPI	87	15	103	13	1,334
ALDOLASE	88	6	49	6	0,116
ADH	85	11	161	13	0,356
AAT	102	12	132	12	0,449
NAD-MDH	101	41	92	28	4,686
NADP-MDH	79	16	102	22	0,030
NAD-ICDH	91	7	64	11	0,070
NADP-ICDH	78	5	95	6	0,250
LDH	86	20	103	13	0,062
GK	77	16	107	16	0,012
FK	85	15	93	14	0,024
PK	55	5	68	3	0,288

Tableau IV-2

Activités spécifiques relatives de 18 enzymes (figures II-1, II-2 et II-3) mesurées dans les clones AS4.5 et AS1.9 transformés avec une construction antisens et dans les clones contrôles Cl 1 et Cl 3.

* Chaque mesure est la moyenne d'au moins 3 valeurs indépendantes, réalisées en triplicatas

\square La mesure pour les clones contrôles est la moyenne des activités de 2 clones contrôles (Cl1 et 3). Chaque activité est la moyenne de 3 valeurs indépendantes au minimum, réalisée en triplicatas chacune.

	Clones contrôles	Clone SII 22		Clone SII 25	
	Activité moyenne [□] en Unités/mg prot.	Activité* en % par rapport à l'act. du contrôle	Erreur Standard en %	Activité* en % par rapport à l'act. du contrôle	Erreur Standard en %
PDC	0,099	116	8	114	15
PFK	0,058	90	5	106	10
FBPase	0,016	99	3	113	9
PFP	0,221	90	7	103	7
NAD-GAPDH	1,088	67	6	124	5
NADP-GAPDH	0,008	63	26	141	38
TPI	1,334	89	8	118	3
ALDOLASE	0,116	91	8	52	7
ADH	0,356	74	7	101	4
AAT	0,449	78	11	95	13
NAD-MDH	4,686	120	20	184	21
NADP-MDH	0,030	94	6	90	12
NAD-ICDH	0,070	90	12	79	29
NADP-ICDH	0,250	88	10	43	55
LDH	0,062	87	11	90	26
GK	0,012	59	10	78	26
FK	0,024	69	6	74	28
PK	0,288	115	6	123	12

Tableau IV-3

Activités spécifiques relatives de 18 enzymes (figures II-1, II-2 et II-3) mesurées dans les clones S2.22 et S2.25 transformés avec une construction sens et dans les clones contrôles Cl 1 et Cl 3.

* Chaque mesure est la moyenne d'au moins 3 valeurs indépendantes, réalisées en triplicatas

□ La mesure pour les clones contrôles est la moyenne des activités de 2 clones contrôles (Cl1 et 3). Chaque activité est la moyenne de 3 valeurs indépendantes au minimum, réalisée en triplicatas chacune.

même ordre de grandeur. Suite aux résultats détaillés dans les tableaux IV-2 et IV-3, nous avons noté aucun changement significatif dans les mesures d'activité des clones sur ou sous exprimant l'activité PK par rapport aux clones contrôles à l'exception de l'activité MDH à NAD qui présente des valeurs élevées dans les 2 clones sens.

6- Mesures de croissance

Les mesures de croissance ont été réalisées sur les clones racinaires AS4.4, AS4.5 et AS1.9, ainsi que sur un clone contrôle CI 1. AS4.4 et AS4.5 ont constamment donné des niveaux faibles de PK dans les tests d'activité, les western-blot après SDS-PAGE ou gel natif. Cette expérience consiste à mesurer des paramètres de la croissance (longueur totale et nombre d'apex racinaires d'un système racinaire) sur une durée de 16 jours. Chaque culture a été inoculée avec une seule apex racinaire de 0,7 cm au jour 0. Les courbes montrent une croissance moins rapide des clones antisens AS4.4, AS4.5 et AS1.9 par rapport au contrôle 1. Ceci est évident quand on considère la longueur totale du système racinaire au cours du temps (figure IV-10) et le nombre d'apex racinaires générées au cours du temps (figure IV-11). Les données montrent donc un effet marqué de la diminution de la PK cytosolique sur la croissance mesurée à l'aide du logiciel WinRhizo.

Longueur totale du
système racinaire
(cms)

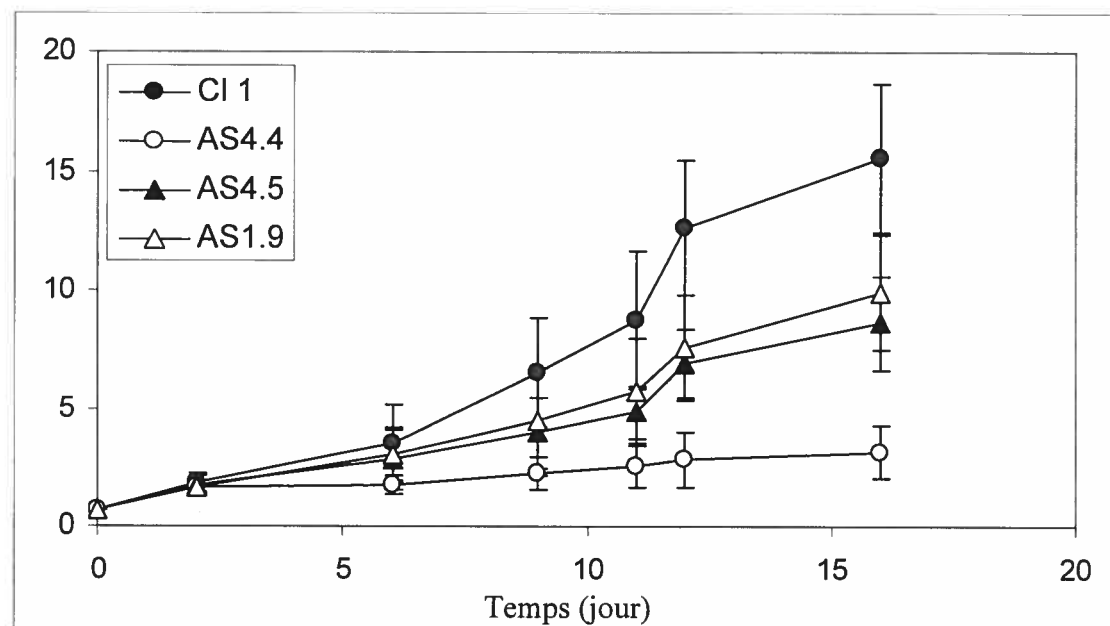


Figure IV-10

Courbes de croissance représentant la longueur totale du système racinaire en cm au cours du temps, soit une période de 16 jours.

L'expérience a été réalisée sur 4 clones (1 contrôle et 3 antisens)

Nombre d'apex
racinaires du
système racinaire

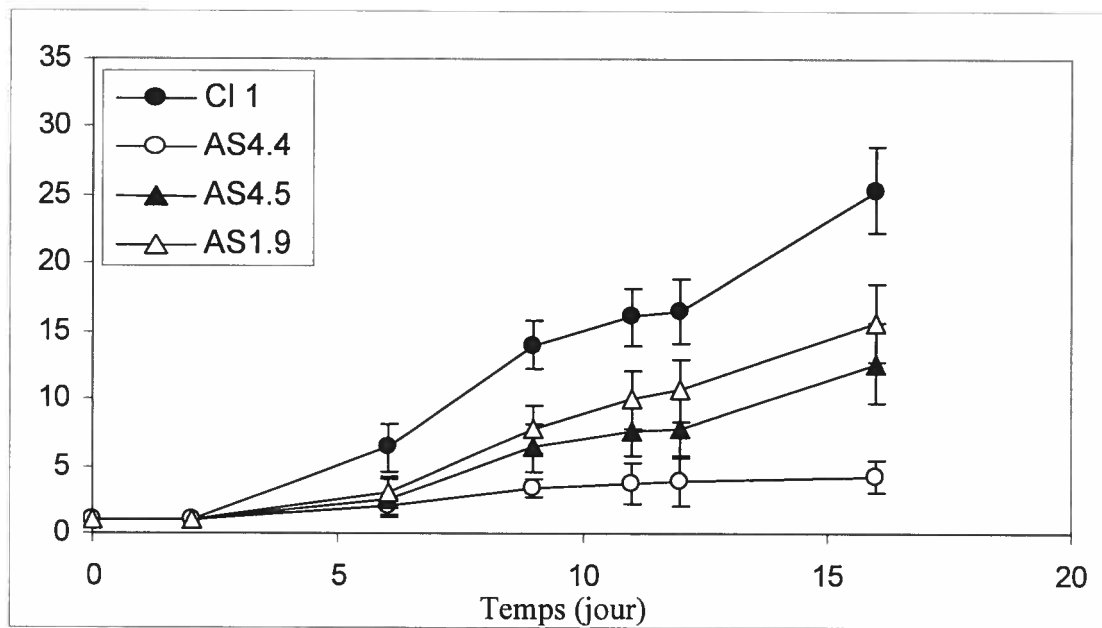


Figure IV-11

Courbes de croissance représentant le nombre d'apex racinaires du système racinaire au cours du temps, soit une période de 16 jours.
L'expérience a été réalisée sur 4 clones (1 contrôle et 3 antisens)

V- Discussion

Le but de mon projet de maîtrise était de générer une population de racines transgéniques possédant des niveaux altérés d'activité enzymatique PK afin d'entreprendre une analyse du contrôle métabolique exercé par cette enzyme et d'étudier les répercussions métaboliques de la manipulation de la PKc. Nous avons utilisé la pomme de terre *Solanum tuberosum* comme système modèle car cette plante est facilement utilisable pour toutes les techniques qui ont été utilisées pour cette étude. De plus, elle a été abondamment utilisée comme plante modèle dans des études sur le métabolisme carboné. Il y a donc déjà beaucoup de données dans la littérature sur la glycolyse chez la pomme de terre. Un projet similaire à celui-ci a été développé dans le laboratoire avec les enzymes hexokinase et triose phosphate isomérase.

La modification du métabolisme primaire est un exercice quelquefois difficile. En effet, à plusieurs occasions, des tentatives de sur-exprimer ou sous-exprimer une enzyme du métabolisme primaire se sont soldées par des échecs. Il semble qu'il existe des mécanismes régulateurs qui s'opposent à la modification du niveau de certaines enzymes.

Une tentative de modification de l'expression de la PKc a déjà été effectuée dans le passé (Gottlob-Mc Hugh *et al.*, 1992). Des plants de tabac avaient alors été transformés pour sur-exprimer la PKc dans les plastes. Cette expérience a généré, de façon inattendue, des plantes dont le niveau de PKc dans les feuilles était inférieur à 2% du niveau normal. Aucun sur-expresseur n'a pu être généré. L'effet était spécifique aux feuilles puisque les racines de ces plants avaient des niveaux de PKc normaux (Knowles

et al., 1998). Bien qu'un phénomène de co-suppression ait été évoqué pour expliquer ces résultats, aucune preuve n'a été fournie jusqu'à présent.

Pour générer la population de racines transformées de notre projet, nous avons utilisé *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteur de transformation. Cette technique de transformation par cette bactérie donne la maladie des racines chevelues aux tissus infectés (Visser *et al.*, 1989). Les avantages de cette technique sont nombreux : l'obtention de matériel transformé est très rapide, comparativement à d'autres techniques de transformation ; en effet, après l'infection des tissus, soit après 10 à 12 jours, on observe l'apparition de racines transgéniques. On obtient également un grand choix d'individus transformés car chaque racine est un clone que l'on peut propager à l'infini sur un milieu de culture. De plus, la croissance des clones racinaires est généralement rapide et les racines sont stables génétiquement et biochimiquement. Enfin on peut également essayer, si on le désire, de régénérer une plante entière à partir d'un clone racinaire ce qui permet d'étendre l'étude à d'autres organes, bien que la pluripotence des cellules et des tissus cultivés *in vitro* ne soit pas garantie.

1- La stratégie utilisée permet la sous-expression mais pas la sur-expression de la PKc

Nous avons généré différentes constructions avec des orientations sens et antisens avec l'ADNc de la PKc. Pour surexprimer la PK, nous avons choisi 2 constructions de longueurs différentes. La première (S1) correspond à la séquence codante et pour la deuxième (S2), nous avons choisi une construction plus longue de 475 paires de base à l'extrémité 3'. Nous avons choisi ces 2 constructions car il s'avère dans

certains cas, que les régions non traduites ont un effet stabilisateur ou déstabilisateur sur l'ARN messager. Il a été suggéré par exemple que ces régions possèdent des sites de fixation pour des protéines qui agissent soit comme des stabilisateurs de la conformation structurale, soit comme des protecteurs vis-à-vis d'attaques d'endonucléases ou encore comme des stabilisateurs d'un complexe susceptible de se lier dans la région non traduite de l'extrémité N-terminale (Katz et Danon, 2002 ; Memon *et al.*, 1996). Comme l'existence de tels mécanismes est inconnue pour la PKc, nous avons préparé des constructions sens complètes en 3' ou partiellement tronquées. Pour sous-exprimer la PK, nous avons choisi la stratégie la plus utilisée pour diminuer l'expression d'une protéine, les constructions antisens. Cette technique consiste à exprimer de manière constitutive, un morceau ou la totalité de la séquence d'intérêt en orientation antisens, qui sont ensuite transcrits et s'hybrident avec l'ARN messager sens complémentaire. Cela forme un complexe ARN double brin qui empêche la transcription, par la suite cet hybride est reconnu et détruit par des RNAses. La conséquence normale de cette technique est une diminution de l'expression de la protéine d'intérêt. Nous avons choisi différentes longueurs de séquence afin de maximiser les chances d'efficacité des inserts. Nous avons choisi 4 constructions : 2 correspondent aux constructions sens, mais insérées en orientation antisens (AS3 et AS4) et les 2 autres correspondent chacune à une moitié de la séquence. Nous n'avons pas obtenu de clones positifs pour la construction AS3 (figure III-3 et tableau IV-1), mais nous n'avons pas investigué cet aspect du projet plus en profondeur. Nous avons des clones correspondant aux constructions AS4, AS1 et AS2. La totalité des constructions a été choisie suivant la disponibilité des sites de restriction présents dans la séquence PK.

Nous avons également généré plusieurs lignées transformées avec le vecteur d'expression binaire pGA643, vide. Ces lignées appelées « contrôles » sont nécessaires afin d'avoir des lignées servant de référence pour l'activité PK. Pour analyser les résultats obtenus avec les lignées transformées, nous avons utilisé ces lignées afin de s'assurer que les effets observés étaient uniquement dus à l'insertion du transgène et non à la technique de transformation ou à l'insertion du vecteur lui-même dans le génome. Pour vérifier ces derniers, nous aurions pu insérer un autre contrôle, celui formé de racines excisées non transformées. Ce contrôle nous aurait alors permis de déterminer l'impact de la transformation sur le métabolisme des racines en comparant les racines excisées transformées et excisées non transformées. Nous aurions pu également déterminer si l'insertion du vecteur pGA643 dans le génome avait une influence sur la régulation du métabolisme racinaire.

Nous avons généré au total, un peu moins de 400 clones racinaires, afin de maximiser nos chances à trouver des candidats intéressants. A la suite d'un premier criblage de 110 clones par l'intermédiaire de la mesure de l'activité enzymatique totale PK, nous avons gardé 69 clones. La première constatation après ce criblage est que nous avons eu de la difficulté à trouver des clones sur-exprimant l'activité PK. En effet, sur les 110 clones criblés, 53% représentaient des clones transformés avec une construction sens, contre 34% transformés avec une construction antisens et 13% avec le vecteur vide. Nous avons criblé beaucoup plus de clones transformés avec une construction sens, car la majorité d'entre eux ne montraient aucune augmentation d'activité significative par rapport aux racines contrôles. Les activités PK des racines transformées avec une construction sens sont comprises entre 106 et 123% de l'activité mesurée dans les racines contrôles. Cela suggère que les racines de pomme de terre sont « résistantes » à

une augmentation d'activité enzymatique PK cytosolique. Contrairement aux travaux du groupe de David Dennis (Gottlob-Mc Hugh *et al.*, 1992 ; Knowles *et al.*, 1998), nous n'avons apparemment pas eu de phénomène de co-suppression dans les clones portant les 2 constructions S1 et S2. Le but des travaux du groupe de David Dennis était de surexprimer la PK isoforme cytosolique dans les plastes de plants de tabac. Deux plants transgéniques ont été trouvés avec une absence de PK cytosolique dans leur feuilles. Ce phénomène a été associé au mécanisme de co-suppression où l'introduction de transgène homologue à celui déjà présent dans la plante sauvage entraîne une suppression de l'enzyme codée par ce gène (Goring *et al.*, 1991).

La deuxième constatation concerne les clones transformés avec une construction antisens. Ces racines possèdent des activités PK avec des valeurs comprises entre 55 et 90%. Ces valeurs peuvent sembler peu différentes des contrôles à première vue. Cependant, les cellules végétales contiennent 2 formes de PK. L'une est localisée dans les plastes chlorophylliens et non-chlorophylliens (PKp) (Plaxton, 1996). L'autre est présente dans le cytoplasme (PKc). Les estimations concernant les quantités relatives de PKc et PKp sont rares dans la littérature (Smith *et al.*, 2000 ; Gottlob-McHugh *et al.*, 1992). Il semble cependant que la PKc soit l'isoforme prédominante avec au moins 70-80% de l'activité PK totale (Smith *et al.*, 2000 ; Gottlob-McHugh *et al.*, 1992). Ceci indique que dans le clone AS4.5, qui contient environ 50% de l'activité totale PK, la PKc aurait diminué de 2/3, si comme planifié, seule la PKc a été affectée par la stratégie antisens. Cet aspect devra être formellement démontré par Northern-Blot. Les 2 sous-unités ne sont pas reconnues par leurs anticorps respectifs (Smith *et al.*, 2000 ; Rivoal *et al.*, 2002). Les anticorps anti-PKc sont donc spécifiques pour l'isoforme cytosolique. Les estimations du niveau de la PKc faites avec les anticorps dans ce mémoire sont donc

probablement une estimation assez bonne de la quantité de PKc des différents clones. En effet, l'analyse sur gel natif, suivie d'un transfert et d'une immunodétection (figure IV-6), ainsi que le western-blot réalisé sur la population de clones (figure IV-7) montrent bien une diminution de l'expression PKc dans les clones AS4.4 et AS4.5 par rapport aux clones contrôles. Par conséquent, nous pouvons affirmer que les clones AS4.4 et AS4.5, qui ont été sélectionnés dans un premier temps pour leurs faibles activités enzymatiques PK, possèdent réellement un niveau d'expression de PKc plus bas que celui des clones contrôles. Il est à noter que pour ces derniers, au vu des niveaux de variations observées entre les différentes lignées Cl (figure IV-1), nous aurions pu envisager un échantillonnage plus grand pour les clones contrôles. Cela nous aurait permis d'évaluer le niveau de variabilité intra-spécifique et nous aurions pu conserver uniquement les clones qui se démarquaient de façon claire des clones contrôles, comme c'est le cas pour les clones AS4.4 et AS4.5. La population finale de candidats aurait été plus restreinte et certains résultats (figures IV-8 et IV-9) auraient peut-être pu s'avérer plus compréhensibles.

2- La PKc apparaît susceptible à la dégradation protéolytique dans les racines de pomme de terre

Sur les profils d'expressions protéiques par SDS-PAGE et western-blots, nous avons pu constater la présence de 2 bandes, proches des poids moléculaires 55-56 kDa, détectées avec l'anticorps anti-*Brassica napus* PKc. En s'appuyant sur la littérature, nous avons conclu que ce profil de 2 bandes correspondait à la taille attendue pour des peptides PKc (Hu et Plaxton, 1996 ; Tang *et al.*, 2003). Cependant, des peptides de taille

plus faible (entre 35 et 50 kDa) ont aussi été détectés. Il a été démontré dans les graines de soja en développement que la PKc pouvait subir une dégradation à l'extrémité C-terminale (Tang *et al.*, 2003). En effet, au cours du développement des graines de soja, le polypeptide de 55 kDa qui est la taille normale attendue, disparaît progressivement et laisse la place à un polypeptide de 51 kDa et à des peptides plus petits. De manière surprenante, ce polypeptide possède toujours l'activité PK et se trouve être activé par l'aspartate, un effecteur allostérique. Par conséquent, la protéine est toujours fonctionnelle, malgré cette troncation à l'extrémité C-terminale. Il a été suggéré que cela pourrait affecter ses propriétés de régulation ; ce polypeptide de 51 kDa pourrait alors être une forme stable du polypeptide car celui-ci montre une accumulation constante au cours du développement au détriment du polypeptide de 55 kDa qui disparaît.

Un autre mode de régulation post-traductionnelle est décrit dans cette étude (Tang *et al.*, 2003). En effet, par analyse de séquences, 2 sites potentiels de phosphorylation ont été déterminés (Ser²²⁰ et Ser⁴⁰⁷). Après migration sur un gel de polyacrylamide dénaturant, il s'est avéré que les polypeptides phosphorylés avaient une taille comprise entre 20 et 51 kDa, soit inférieure à celle du peptide pleine longueur de 55 kDa. De plus, il a été démontré par immunoprécipitation que ces polypeptides étaient ubiquitinés. Les auteurs ont démontré que la PKc était effectivement soumise à une dégradation par le protéasome, médiée par une ubiquitination. La dégradation ubiquitine-dépendante a été largement étudiée chez les plantes (Cough et Vierstra, 1997 ; Smalle et Vierstra, 2004). Ce mécanisme de phosphorylation/ubiquitination suivi d'une dégradation par le protéasome a été proposé pour être l'un des mécanismes de régulation post-traductionnelle de la PKc en plus de celui associé à la coupure à l'extrémité C-terminale (Tang *et al.*, 2003).

Nos résultats des études menées avec différents inhibiteurs de protéases (figure IV-2) indique que des inhibiteurs du protéasome (exemple : MG132) peuvent augmenter l'intensité des bandes à 55-56 kDa sur les blots. De plus, cet inhibiteur utilisé lors de l'extraction fait disparaître certaines bandes de faibles poids moléculaires sur les blots. Une explication possible pour ces résultats est qu'une partie de la PKc des racines de pomme de terre soit engagée ou liée avec le protéasome. Le MG132 ajouté lors de l'extraction empêcherait la poursuite de la dégradation par le protéasome. Une liaison avec le protéasome pourrait expliquer le profil natif « en traînée » observé dans l'analyse 2D (natif/SDS-PAGE). Ceci suggère que les niveaux de PKc dans les racines sont possiblement contrôlés par le protéasome à l'aide d'un mécanisme semblable à celui découvert par Tang *et al.*, (2003). Il est possible que le protéasome empêche l'accumulation trop grande de PKc dans les racines « sens ». Cette hypothèse devra cependant être testée formellement.

Afin de corréliser les activités enzymatiques mesurées avec les niveaux de protéines PK et de limiter la protéolyse de la PK, nous avons utilisé une solution d'acide trichoroacétique 10% pour l'extraction des protéines de la population sélectionnée. Nous avons réalisé un western-blot sur ces individus avec le même anticorps anti-*Brassica napus* PKc (figure IV-7). Nous avons pu confirmer que les expressions protéiques de la PKc pour les clones AS4.5 et AS4.4 sont bien inférieures à celles détectées dans les plants contrôles. Cette technique a permis de contrôler la dégradation de la PKc pendant l'extraction. Cependant, on observe toujours des bandes de faibles poids moléculaires dans les extraits (figure IV-7). Ceci indique donc que des fragments de PKc sont présents *in vivo*, peut-être issus de la dégradation importante de cette enzyme par le

protéasome. On peut également supposer que ces bandes ne correspondent peut-être pas à la PKc.

Face à ce problème de protéolyse, nous avons également testé d'autres inhibiteurs de la dégradation sur un clone contrôle lors de l'extraction des protéines. Nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques aux protéases à sérine tels que le benzamidine, l'acide ϵ -amino-n-caproïque et le PMSF, aux protéases à cystéine avec la leupeptine et E64 également des inhibiteurs dirigés contre les protéases à aspartate avec la pepstatine et enfin contre les métalloprotéases avec l'EGTA. Nous avons obtenu le même profil que précédemment c'est-à-dire 2 bandes de fortes intensités (55 et 56 kDa) et des bandes de poids moléculaires plus faibles (entre 35 et 50 kDa) (figure IV-2). En intégrant visuellement l'ensemble des signaux dans une piste, il semble que la dégradation soit plus faible en présence d'inhibiteurs dirigés contre des protéases à cystéine et également d'inhibiteurs dirigés contre le protéasome. Ce dernier semble bel et bien être un des acteurs impliqués dans la dégradation de la PKc et les protéases à cystéine peuvent également faire parties de la machinerie de dégradation. Il est à noter que l'activité PKc extraite de racines apparaît stable une fois l'extraction faite. En effet, quand nous avons suivi l'activité PK au cours du temps (figure IV-3), nous n'avons pas détecté de baisse notable de l'activité dans les clones contrôle, sens ou antisens. Ceci implique qu'une protéolyse de la PKc *in vitro* n'est pas une raison expliquant l'absence de surexpresses dans notre population.

Après la génération de racines de pomme de terre avec des niveaux altérés de PK, nous avons caractérisé partiellement cette population. Nous avons, en particulier, voulu corrélérer le niveau d'expression de protéines PK cytosolique présente dans les racines avec l'activité enzymatique totale PK mesurée (figure IV-1). Pour cela, nous

avons utilisé un anticorps anti-*Brassica napus* PKc sur des extraits protéiques obtenus avec le tampon d'extraction utilisé pour mesurer les activités enzymatiques. Les profils d'expression que nous avons obtenus (figure IV-6) montrent une tendance selon laquelle l'expression protéique spécifique à la PK cytosolique semble être corrélée à l'activité totale PK mesurée. La corrélation est très apparente pour les clones AS1.9, AS4.4 et AS4.5. En effet, la quantité de protéine PKc est beaucoup plus faible pour les clones AS1.9, AS4.4 et AS4.5 avec des activités mesurées respectives de 68, 74 et 55 % par rapport à celle détectée dans les racines contrôles (Cl 1, Cl 2). En ce qui concerne les autres clones, on constate que lorsque l'on tient compte des erreurs standards, les valeurs d'activité enzymatique sont alors très proches, voire comprises à l'intérieur de celles des contrôles. Par conséquent, il n'est pas surprenant d'observer peu de différences dans les profils d'expressions sur les western-blots. Une estimation visuelle des bandes PKc (figures IV-6 et IV-7) corrobore l'estimation faite plus haut donnant une diminution d'environ 2/3 de l'activité PKc dans les transgéniques AS4.4 et AS4.5.

3- Caractérisation préliminaire des racines transgéniques

Comme il a été mentionné auparavant, ce projet était la première étape d'une étude qui consiste à déterminer le rôle de la PK dans la régulation du flux glycolytique en conditions normoxique et anoxique. Une caractérisation métabolique détaillée des lignées transgéniques sera faite à la suite du projet. Mais avant cela, nous devons évaluer si c'est seulement l'activité de la PK qui avait été modifiée. En effet, cela permettra de faire par la suite, le lien direct entre une éventuelle modification de flux et l'enzyme PK. L'un des substrats de la PK est le PEP qui est un métabolite important

dans la voie de la glycolyse. En effet, en plus d'être le métabolite phosphorylé possédant la plus grande énergie, le PEP est situé à un point de branchement en étant à la fois le substrat de plusieurs enzymes qui sont la PEPase, la PEPC et la PK. C'est pourquoi, nous avons mesuré les activités PEPase et PEPC pour l'ensemble des clones de la population sélectionnée afin d'observer d'éventuelles modifications de ces activités enzymatiques. Cela nous permet de voir si le flux glycolytique du PEP au pyruvate (via la PK) est repartagé et redirigé ailleurs parmi les clones avec des activités PK différentes. Cependant il est à noter que ces mesures d'activité enzymatique ont été effectuées *ex vivo* et n'offrent par conséquent qu'un estimé des flux métaboliques cellulaires maximaux. Habituellement, le glucose marqué radioactivement est utilisé dans la quantification des flux métaboliques (Rivoal et Hanson, 1994). Les activités PEPase et PEPC n'ont pas beaucoup varié dans les clones sur ou sous exprimant la PK comparativement aux activités des clones contrôles. Des études de corrélation entre la PK et la PEPC (figure IV-8) ainsi que la PK et la PEPase (figure IV-9) ont permis de montrer une corrélation modeste entre l'activité PK et ces 2 enzymes. L'indice de corrélation du graphique représentant l'activité PK en fonction de l'activité PEPase est de 0,093 ce qui signifie qu'il y a peu d'effet d'une enzyme sur l'autre. Quant à la deuxième corrélation (PK/PEPC), l'indice est de 0,239 ce qui signifie qu'il y aurait une légère tendance. L'activité PEPC augmenterait en fonction de l'augmentation de l'activité PK. Ces données ne sont pas sans rappeler une étude faite par Yanagisawa *et al.*, (2004) démontrant une corrélation entre l'expression PK et PEPC dans des plantes transformées avec le facteur de transcription Dof1. Dans cette étude, le facteur de transcription Dof1 a été inséré dans des plants d'*Arabidopsis thaliana* afin de modifier son métabolisme. En effet, Dof1 est un activateur d'expression de nombreux gènes

associés avec le métabolisme organique. Les expressions des gènes PK et PEPC ont été augmentées de 2 à 3 fois dans les plants transgéniques comparativement aux plants contrôles et cela de manière coordonnée. Il en est de même pour les activités enzymatiques PK et PEPC qui ont été augmentées environ de 30% dans les plants transgéniques. Le lien entre les activités des enzymes PK et PEPC que nous observons dans notre population mériterait d'être étudié plus profondément. Par exemple, nous pourrions évaluer les niveaux de Dof1 dans les clones de notre population.

Nous avons également mesuré les activités d'autres enzymes (tableaux IV-2 et IV-3), associées à la voie de la glycolyse ou non, afin de savoir si une variation de l'activité PK a eu une influence sur d'autres enzymes. Nous avons testé la PDC, la LDH et l'ADH, enzymes de la fermentation qui est fournie par le pyruvate, produit de la PK. Le pyruvate est également utilisé dans la réaction réversible catalysée par l'AAT pour former l'acide aminé, alanine. Nous avons également mesuré l'HK (GK et FK), la PFK et la PFP qui sont considérées comme des enzymes jouant un rôle majeur dans la régulation de la glycolyse. De plus, le PEP inhibe la PFK, par conséquent, une réduction dans la quantité de PEP, conséquence d'une augmentation de l'activité PK devrait lever la rétro-inhibition et augmenter l'activité PFK. Nous avons également mesuré l'ICDH, dépendante du NAD et NADP, qui produit du 2-oxoglutarate, impliqué dans l'assimilation du NH_4^+ , via le système GS/GOGAT dans le plaste. Nous avons également mesuré la MDH, dépendante du NAD et NADP, qui utilise l'OAA, produit de la PEPC pour donner du malate. Enfin, les enzymes glycolytiques FBPase, GAPDH, TPI et aldolase ont été également testées. Ces activités ont été mesurées sur 6 clones, 2 extrêmes sous-exprimant la PK (AS4.5 et AS1.9), 2 extrêmes sur-exprimant la PK (S2.22 et S2.25) ainsi que 2 clones contrôles (Cl 1 et Cl 3). A l'exception de l'activité

NAD-MDH accrue dans 2 clones sens, nous n'avons observé aucune variation significative dans les activités, parmi l'ensemble des clones. Cela signifie que la modification de l'activité PK n'a pas engendrée de façon dramatique des variations d'activités enzymatiques dans le voisinage de l'enzyme PK. Par conséquent nous pouvons conclure que toute éventuelle modification de flux ou de niveau de métabolites observés dans la suite de l'étude pourra être principalement associée à l'insertion du transgène.

Nous n'avons pas réussi à modifier de manière drastique les activités PK, mais cela ne signifie pas que les racines transformées n'aient pas subi de modifications métaboliques. En effet, on peut trouver dans la littérature quelques exemples dans lesquels une diminution d'activité comprise entre 20 et 40% a un effet sur le métabolisme des plantes transformées. En particulier, une étude a été conduite par Henkes *et al.*, (2001) et a consisté à transformer des plants de tabac avec une construction contenant une séquence en orientation antisens codant pour l'enzyme transketolase (TK). Cette enzyme est localisée dans le plaste et joue un rôle au niveau de l'interface entre les métabolismes primaire et secondaire en catalysant des réactions dans le cycle de Calvin et dans la voie oxydative des pentoses phosphate (Schenk *et al.*, 1998). Des plants de tabac avec une activité diminuée pour la TK ont montré de grandes modifications métaboliques. En effet, avec une diminution d'activité comprise entre 20 et 40%, on observe entre autres, une diminution de la photosynthèse et une diminution des quantités de sucre et d'acides aminés. Ces changements s'accompagnent également d'une baisse de croissance. Une faible diminution de l'activité enzymatique TK influence donc le métabolisme. Dans ce cas-ci, il n'existe pas de voie alternative pour contourner et compenser la réaction catalysée par la TK. Cette étude montre la

diminution d'activité TK, donc que cette enzyme est contrôlante pour d'autres voies métaboliques et affecte également la croissance des plantes.

La modification du contenu en PKc, bien que modeste, semble avoir un impact majeur au niveau de la croissance des racines transformées. Dans la population que nous avons générée, nous avons observé une variation de croissance avec les clones antisens AS1.9, AS4.4 et AS4.5. La voie glycolytique est présente à la fois dans le cytoplasme et les plastes. De plus, il existe des connexions aux différents niveaux de bassins, par l'intermédiaire de transporteurs entre le cytoplasme et les plastes. Ces enzymes sont présentes en multiples isoformes, par conséquent on aurait pu s'attendre à une absence de phénotype du fait que la réaction PKc peut être compensée et contournée. Cette absence de phénotypes est d'ailleurs présente dans plusieurs études qui avaient pour but de moduler l'expression d'enzymes dites « clé » comme la phosphofructokinase (Burrell *et al.*, 1994), la fructose-6-phosphate phosphotransférase pyrophosphate-dépendante (Hajirezaei *et al.*, 1994) ou encore la citrate synthase (Landschütze *et al.*, 1995).

Lors de la caractérisation préliminaire des plantes contenant moins de 2% de PKc, l'absence de PKc dans des plants transgéniques de tabac *Nicotiana tabacum* (Gottlob-McHugh *et al.*, 1992) n'entraînait aucune modification phénotypique par rapport aux plants sauvages. Les taux de photosynthèse et de respiration semblaient également identiques par rapport aux plants contrôles. Mais cette absence de changements morphologiques était due aux conditions optimales de culture. En effet, par la suite, la descendance homozygote de ces plants a été étudiée (Knowles *et al.*, 1998) dans des conditions de croissance avec des intensités de lumière basses ou modérées. Dans ces conditions, il a été observé un retard de croissance, des modifications morphologiques et également une diminution dans la biomasse des racines et du rapport

racine/partie aérienne. Le fait que l'on observe une diminution de croissance des clones AS4.4 et AS4.5 est donc hautement significatif. Il faut aussi noter que cet impact majeur sur la croissance est en accord avec les conclusions des travaux du laboratoire de Bill Plaxton selon lesquelles la PKc est une enzyme très importante dans le contrôle de la glycolyse (Plaxton, 1996 ; Hu et Plaxton, 1996 ; Smith *et al.*, 2000). Ces racines poussent sur un milieu très riche (MS) et dans des conditions optimales. Par conséquent, il est important de noter que le fait d'avoir utilisé ce milieu de culture unique pour l'ensemble des lignées a peut-être masqué des modifications métaboliques engendrées par l'insertion des différentes constructions. On peut penser que la demande en glucides pour les lignées sens est supérieure à celle des lignées contrôles. Donc le fait d'en avoir fourni une grande quantité par l'intermédiaire de ce milieu riche a peut-être caché un déséquilibre métabolique, engendré par l'insertion des constructions sens. Les conditions n'étaient pas drastiques et les lignées se comportent donc à quelques exceptions près, de la même manière. C'est pourquoi il sera intéressant d'étudier notre population dans des conditions de stress anoxique afin de déterminer son rôle dans cette condition comparativement aux conditions normoxiques. Enfin, d'autres expériences sont en cours dans lesquelles la quantification des niveaux des sucres, des acides organiques et des acides aminés tendent à montrer que les clones AS4.4 et AS4.5 ont un métabolisme primaire très affecté (Rivoal *et al.*, en préparation).

VI- Conclusion

Mon projet de maîtrise portait sur l'étude d'une enzyme de la voie glycolytique : la PKc. Il est la première étape d'un projet à longue échéance, qui porte sur l'évaluation de l'implication de la PKc dans la régulation *in vivo* de la glycolyse en conditions normoxique et anoxique. Cette enzyme est considérée comme un élément « clé » dans la régulation glycolytique et jouerait un rôle central dans le contrôle du flux glycolytique (Plaxton, 1996 ; Thomas *et al.*, 1997).

Mon projet était de générer une population de racines transgéniques de pomme de terre *Solanum tuberosum* avec des niveaux altérés de PKc. Cette population sera par la suite utilisée pour déterminer le rôle de la PKc dans la régulation *in vivo* glycolytique. Nous avons obtenu une grande population de clones qui ont été criblés afin de trouver les meilleurs candidats. Il s'est avéré que nous n'avons pas trouvé de clones sur-exprimant la PKc, démontrant « une résistance » à la sur-expression de l'enzyme dans les racines de pomme de terre, par la technique de transgénèse que nous avons utilisée. Les mécanismes responsables de cette « résistance » restent à découvrir, mais pourraient impliquer des mécanismes de co-suppression et/ou de protéolyse *in vivo* par la voie du protéasome. En revanche, nous avons trouvé quelques clones sous-exprimant la PKc. La diminution du niveau d'expression de la PKc dans ces racines transgéniques par rapport aux clones contrôles a été vérifiée et confirmée par différentes techniques (activités enzymatiques, gel natif, western-blots...). Lors de cette caractérisation préliminaire, nous avons été confronté à des problèmes de dégradations spécifiques à la PKc. Cela nous suggère que le niveau d'expression de la PKc est hautement contrôlée dans la

cellule et nous donne des informations préliminaires sur l'importance de son rôle dans le métabolisme carboné.

Des expériences ultérieures sont en cours sur les clones antisens AS1.9, AS4.4 et AS4.5 qui se sont avérés être de bons candidats pour notre étude. Des mesures de croissance ont été faites sur ces clones antisens et ont démontré une diminution du nombre d'apex racinaires et de la longueur totale du système racinaire par rapport aux clones contrôles. Ces résultats démontrent une implication de la PKc dans la croissance des racines de pomme de terre. De plus, des analyses de teneurs en sucres, en acides organiques et en acides aminés ont été réalisés sur ces clones, confirmant que leur métabolisme primaire a été modifié. Les clones antisens (AS) sélectionnés serviront à déterminer par la suite l'implication de la PKc dans la régulation *in vivo* de la glycolyse par l'intermédiaire de l'analyse du contrôle métabolique.

Références Bibliographiques

An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., Ha, S.B. (1988) Binary vectors. *In* SB Gelvin, Ra Schilperoort, eds, *Plant Mol. Biol. Manual*, A3. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 1-19

Aono, T., Kanada, N., Ijima, A., Oyaizu, H. (2001) The response of the phosphate uptake system and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. *Plant Cell Physiol.*, 42, 1253-1264

Bachmann, M., Huber, J.L., Liao, P.C., Gage, D.A., Huber, S.C. (1996) The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS lett.*, 387, 127-131

Borchert, S., Harborth, J., Schunemann, D., Hoferichter, P., Heldt, H.W. (1993) Studies of the enzymatic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiol.*, 101, 303-312

Botha, F.C., Potgieter, G.P., Botha, A-M. (1992) Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regul.*, 11, 211-224

Blakeley, S.D., Plaxton, W.C., Dennis, D.T. (1990) Cloning and characterization of a cDNA for the cytosolic isozyme of plant pyruvate kinase: the relationship between the plant and non-plant enzyme. *Plant Mol. Biol.*, 15, 665-669

Blakeley, S.D., Plaxton, W.C., Dennis, D.T. (1991) Relationship between the subunits of leucoplast pyruvate kinase from *Ricinus communis* and a comparison with the enzyme from other sources. *Plant Physiol.*, 96, 1283-1288

Bouny, J.M. et Saglio, P.H. (1996) Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. *Plant Physiol.*, 111, 187-194

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2002) Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland*

Burrell, M.M., Mooney, P.J., Blundy, M., Carter, D., Wilson, F. (1994) Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta*, 194, 95-101

Cole, K.P., Blakeley S.D., Dennis, D.T. (1992) Structure of the gene encoding potato cytosolic pyruvate kinase. *Gene*, 122, 255-261

Cough, R.C. et Vierstra, R.D. (1997) Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.*, 20, 713-721

Cierieszko, L., Johansson, H., Kleczkowski, L.A. (2001) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem. J.*, 354, 67-72

Davies, D.D., Grego, S., Kenworthy, P. (1974) The control of the production of lactate and ethanol by higher plants. *Planta*, 118, 297-310

Day, D.A. et Hanson, J.B. (1977) Pyruvate and malate transport and oxydation in corn mitochondria. *Plant Physiol.*, 59, 630-635

Dorion, S., Parveen, Jeukens J., Matton D.P. et Rivoal J. (2005) Cloning and characterization of a cytosolic isoform of triosephosphate isomerase developmentally regulated in potato leaves. *Plant Science*, 168, 183-194

Duff, S.M.G., Moorhead, G.B.G., Lefebvre, D.D., Plaxton, W.C. (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate-dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cell cultures. *Plant Physiol.*, 90, 1275-1278

Duff, S.M.G., Plaxton, W.C., Lefebvre, D.D. (1991) a. Phosphate-starvation response in plant cells: de novo synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9538-9542

Duff, S.M.G., Lefebvre, D.D., Plaxton, W.C. (1991) b. Purification, characterization, and subcellular localization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension cultures: comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 286, 226–32

Edwards, S., Nguyen, B.-T., Do, B., Roberts J.K.M. (1998) Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and the Krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.*, 116, 1073-1081

Falkner, G., Horner, F., Werdan, K., Heldt, H.W. (1976) pH changes in the cytoplasm of the blue-green alga *Anacystis nidulans* caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. *Plant Physiol.*, 58, 717-718

Fell, D.A. (1992). Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem. J.*, 286, 313-330

Fliege, R., Flügge, U-I., Werdan, K., Heldt, HW (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triose phosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 502, 232-247

Fothergill-Gilmore, LA., Michels, P.A.M. (1993) Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 59, 105-235

Fox, T.C., Mujer, C.V., Andrews, D.L., Williams, A.S., Cobb, B.G., Kennedy, R.A., Rumpho, M.E. (1995) Identification and gene expression of anaerobically induced enolase in *Echinochloa phyllopogon* and *Echinochloa crus-galli*. *Plant Physiol.*, 109, 433-443.

Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J., Sweetlove, L.J. (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell*, 15, 2140-2151

Good, A.G. et Crosby, W.L. (1989) Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol.*, 90, 1305-1309

Goring, D.R., Thomson, L., Rothstein, S.J. (1991) Transformation of a partial nopaline synthase gene into tobacco suppresses the expression of a resident wild-type gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1770-1774

Gottlob-Mc Hugh, S.G., Sangwan, R.S., Blakeley, S.D., Vanlerberghe, G.C., Ko, K., Turpin, D.H., Plaxton, W.C., Miki, B.L., Dennis, D.T. (1992) Normal growth of transgenic tobacco plants in the absence of cytosolic pyruvate kinase. *Plant Physiol.*, 100, 820-825

Gottlob-Mc Hugh, S., Knowles, V.L., Blakeley, S.D., Sangwan, R.S., Dennis, D.T. (1995) Differential expression of cytosolic and plastidic pyruvate kinases in tobacco. *Physiol. Plant.*, 95, 507-514

Gross, A., Bruckner, G., Heldt, H.W., Flugge, U.-I. (1990) Comparison of the kinetics properties, inhibition and labelling of the phosphate translocators from maize and spinach mesophyll chloroplasts. *Planta*, 180, 262-271

Hajirezaei, M., Sonnewald, U., Viola, R., Carlisle, S., Dennis, D.T., Stitt, M. (1994) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta*, 192, 16-30

Häusler, R.E., Holtum, J.A.M., Latzko, E. (1989) Cytosolic phosphofructokinase from spinach leaves. *Plant Physiol.*, 90, 1498-505

Hayakawa, S., Matsunaga, K., Sugiyama, T. (1981) Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.*, 67, 133-138

Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., Stitt, M. (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 13, 535-551

Hill, L.M. et Smith, A.M. (1991) Evidence that glucose 6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by plastids of developing pea embryos. *Planta*, 185, 91-96

Hodgson, R.J. et Plaxton, W.C. (1998) Purification and characterization of cytosolic fructose-1, 6-bisphosphate aldolase from endosperm of germinated castor oil seeds. *Arch Biochem Biophys.*, 355, 189-196

Hoffman, N.E., Bent, A.F., Hanson, A.D. (1986) Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. *Plant Physiol.*, 82, 658-663

Hrazdina, G. et Jensen, R.A. (1992) Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 241-267

Hu, Z. et Plaxton, W.C. (1996) Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from leaves of the castor oil plant. *Arch. Bioch. Biophys.*, 333, 298-307

Jarillo, J.A., Leyva, A., Salinas, J., Martinez-Zapater, J.M. (1993) Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. *Plant Physiol.*, 101, 833-837

Jenner, H.L., Winning, B.M., Millar, A.H., Tomlinson, K.L., Leaver, C.J., Hill, S.A. (2001) NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol.*, 126, 1139-1149

Johnson, J.F., Vance, C.P., Allan, D.L. (1996) Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*-altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.*, 112, 31-41

Jurica, S.M., Mesecar, A., Heath, P.J., Shi, W., Nowak, T., Stoddard, B.L. (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*, 6, 195-210

Katz, Y.S. et Danon, A. (2002) The 3'-untranslated region of chloroplast *psbA* mRNA stabilizes binding of regulatory proteins to the leader of the message. *J. Biol. Chem.*, 277, 18665-18669

Kacser, H. et Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 32, 65-104

Kennedy, R.A., Rumpho, M.E., Fox, T.C. (1992) Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.*, 100, 1-6

Kobr, M.J. et Beevers, H. (1971) Gluconeogenesis in the Castor Bean Endosperm: I. Changes in Glycolytic Intermediates. *Plant Physiol.*, 47, 48-52

Knowles, V.L., Dennis, D.T., Plaxton, W.C. (1989) Purification of a novel pyruvate kinase from a green alga. *FEBS Lett.*, 259, 130-132

Knowles, V.L., Mc Hugh, S.G., Hu, Z., Dennis, D.T., Miki, B.L., Plaxton, W.C. (1998) Altered growth of transgenic tobacco lacking leaf cytosolic pyruvate kinase. *Plant Physiol.*, 116, 45-51

Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*, 130, 2129-2141

Landschütze, V., Willmitzer, L., Müller-Röber, B. (1995) Inhibition of flower formation by antisense repression of mitochondrial citrate synthase in transgenic potato plants leads to specific disintegration of the ovary tissues of flowers. *EMBO J.*, 14, 660-666.

Lin, M., Turpin, H.D., Plaxton, C.W. (1989) Pyruvate kinase isozymes from the green alga, *Selenastrum minutum*. II. Kinetic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 269, 228-238

Martinez-Barajas, E. et Randall, D.D. (1998) Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta*, 205, 567-573.

Memon, A.R., Meng B. et Mullet J.E. (1996) RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast psbA 3'-end untranslated RNA. *Plant Mol.Biol.*, 30, 1195-1205

Miller, S.S., Driscoll, B.T., Gregerson, R.G., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1998) Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule enhanced MDH. *Plant J.*, 15, 173-184

Moraes, T.F. et Plaxton, W.C. (2000) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. Implications for phosphoenolpyruvate carboxylase regulation during phosphate starvation, and the integration of glycolysis with nitrogen assimilation. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4465-4476

Murashige, T. et Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497

Petit, A. et Tempé, J. (1978) Isolation of *Agrobacterium* Ti plasmid regulatory mutants. *Mol. Gen. Genet.*, 167, 147-155

Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse Delbart, F., Tempé, J. (1983) Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.*, 190, 204-214

Plaxton, W.C. (1988) Purification of pyruvate kinase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, 86, 1064-1069

Plaxton, W.C. (1989) Molecular and immunological characterisation of plastid and cytosolic pyruvate kinase isozymes from castor-oil-plant endosperm and leaf. *Eur. J. Biochem.*, 181, 443-451

Plaxton, W.C. (1990) Glycolysis. In P Lea, ed, *Methods in plant biochemistry*, vol. 3, Academic Press, London, 145-173

Plaxton, W.C. (1991) Leucoplast pyruvate kinase from developing castor oil seeds. Characterization of the enzyme's degradation by a cysteine endopeptidase. *Plant Physiol.*, 97, 1334-1338

Plaxton, W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 185-214

Plaxton, W.C., Smith, C.R., Knowles, V.L. (2002) Molecular and regulatory properties of leucoplast pyruvate kinase from *Brassica Napus* (Rapeseed) suspension cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 400, 54-62

Podestá, F.E. et Plaxton, W.C. (1991) Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor oil seeds. *Biochem. J.*, 279, 495-501

Ricard, B., Rivoal, J., Spiteri, A., Pradet, A. (1991) Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant Physiol.*, 95, 669-674

Rivoal, J., Ricard, B., Pradet, A., (1989) Glycolytic and fermentative enzyme induction during anaerobiosis in rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 27, 43-52

Rivoal, J., Ricard, B., Pradet, A., (1990) Purification and partial characterization of pyruvate decarboxylase from *Oryza sativa L.* *Eur. J. Biochem.*, 194, 791-797

Rivoal, J. et Hanson A.D., (1994) Metabolic control of anaerobic glycolysis. Overexpression of lactate dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the Davies-Roberts hypothesis and points to a critical role for lactate secretion. *Plant Physiol.*, 106, 1179-1185

Rivoal, J., Dunford, R., Plaxton, W.C., Turpin, D.H., (1996) Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green alga *Selenastrum minutum* : Evidence that association of the 102-kDa catalytic subunit with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the enzyme *Arch. Biochem. Biophys.*, 332, 47-57

Rivoal, J., Trzos, S., Gage, D.A., Plaxton, W.C., Turpin, D.H. (2001) Two unrelated phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides physically interact in the high molecular mass isoforms of this enzyme in the unicellular green alga *Selenastrum minutum*. *J. Biol. Chem.*, 276, 12588-12597

Rivoal, J., Smith, C.R., Moraes, T.F., Turpin, D.H., Plaxton, W.C. (2002) A method for activity staining after native polyacrylamide gel electrophoresis using a coupled enzyme assay and fluorescence detection: application to the analysis of several glycolytic enzymes. *Anal. Biochem.*, 300, 94-99

Rivoal, J., Dorion, S., Claeysen, E., Zhang, H. (2004) Organization of the plant cytosolic glycolytic pathway and its regulation by abiotic stresses in nonphotosynthetic tissues. *Recent Res. Devel. Environ. Biol.*, 1, 77-100

Roberts, J.K.M., Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V., Freeling, M. (1984) a. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6029-6033

Roberts, J.K.M., Callis, J., Wemmer, D., Walbot, V., Jardetzky, O. (1984) b. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3379-3383

Schäfer, G., Heber, U., Heldt, H.W. (1977) Glucose transport into spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 60, 286-289

Schenk, G., Duggleby, R.G., Nixon, P.F. (1998) Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30, 1297-1318

Smalle, J. et Vierstra, R.D. (2004) The ubiquitin/26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 555-590

Smith, C.R., Knowles, V.L., Plaxton, W.C. (2000) Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4477-4485

Tang, G.-Q., Hardin, S.C., Dewey, R., Huber, S.C. (2003) A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds. *Plant J.*, 34, 77-93

Theodorou, M.E., Cornel, F.A., Duff, S.M., Plaxton, W.C. (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 21901-21905

Thomas, S., Mooney, P.J.F., Burrell, M.M., Fell, D.A. (1997) (a) Finite change analysis of glycolytic intermediates in tuber tissue of lines of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) overexpressing phosphofructokinase. *Biochem. J.*, 322, 111-117

Thomas, S., Mooney, P.J.F., Burrell, M.M., Fell, D.A. (1997) (b) Metabolic control analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochem. J.*, 322, 119-127

Thomson, C.J. et Greenway, H. (1991) Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. *Plant Physiol.*, 96, 1294-1301

Traut, T.W. (1994) Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 29, 125-63

Turner, W.L. et Plaxton, W.C. (2000) Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from banana fruit. *Biochem. J.*, 352, 875-82

Visser, R.G.F., Jacobsen, E., Witholt, B. et Feenstra, B.J. (1989) Efficient transformation of potato (*Solanum tuberosum L.*) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor. Appl. Genet.*, 78, 594-600

Wood, S., King, P.S., Kuzma, M.M., Blakeley S.D., Newcomb, W. et Dennis D.T. (2002) Pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase overexpression in transgenic tobacco: physiological and biochemical analysis of source and sink tissues *Can. J. Bot.*, 80, 983-992

Yamada, K. et Noguchi, T. (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J.*, 337, 1-11

Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H., Miwa, T. (2004) Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 7833-7838