

2m11.2831.1

Université de Montréal

Profil de l'activité kinase lors de la fécondation

par

Julie Poliquin

**Programme de biologie moléculaire**

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Novembre, 1999

© Julie Poliquin, 1999

Université de Montréal



QH  
506  
1154  
2000  
N. 009



Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Profil de l'activité kinase lors de la fécondation

Présenté par

Julie Poliquin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr David S. Morse, Président-rapporteur

Dr Daniel P. Matton, Directeur de recherche

Dr Hargurdeep S. Saïni, Membre du jury

Mémoire accepté le: 00-03-01

# Sommaire

---

Dans le contexte actuel de croissance de la population mondiale, la perspective de pouvoir produire des fruits de meilleure qualité, dans un intervalle de temps raccourci, n'est pas sans intérêts. Pour pouvoir y parvenir, nous devons d'abord éclaircir le fonctionnement des mécanismes de développement du fruit au niveau moléculaire.

Suivant une pollinisation compatible, des changements observables surviennent au niveau du carpelle dont un grossissement de l'ovaire correspondant à sa différenciation en un fruit, ainsi que la maturation des ovules en graines. Ces modifications se produisent en réponse à l'expression différentielle, au niveau du carpelle, de gènes spécifiques. Le but du présent travail est donc d'étudier les voies de transduction de signaux requises lors de l'expression de gènes spécifiques pour la fécondation.

Cette question a été abordée par trois approches principales. Nous avons d'abord étudié par électrophorèse bidimensionnelle, les patrons de protéines traduites *in vitro* à partir d'ARNm présents de 0 à 96 suivant une pollinisation compatible. Ceci nous a permis d'observer l'apparition et la disparition de plusieurs spécimens de protéines suite à la pollinisation et à la fécondation.

Nous avons également procédé à des essais kinases en gel sur des échantillons de protéines des fractions solubles et membranaires d'ovaire de *S. chacoense* recueillis de 0 à 96 heures suivant une pollinisation compatible. Des substrats efficaces auprès d'une grande diversité de protéines kinase ont été utilisés. Ceci nous a permis d'observer des changements dans l'activité de phosphorylation survenant au niveau du carpelle suite à la pollinisation et à la fécondation. Une analyse des acides aminés phosphorylés réalisée sur certaines bandes d'activités kinases a permis de connaître quel type de résidus sont phosphorylés. La purification, même partielle, des protéines kinases impliquées permettrait de déterminer, par essais kinase *in vitro*, leurs spécificités au niveau des substrats et des co-facteurs ainsi que leur sensibilité face à

différents inhibiteurs des protéines kinases. Ceci permettrait de caractériser le type d'activité kinase impliqué.

Enfin, à l'aide d'une technique de criblage fonctionnel nous avons tenté d'isoler des clones d'ADNc présents au niveau du carpelle et démontrant une activité kinase induite en réponse à la fécondation.

# Table des matières

---

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1.0 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 INTÉRÊT DE L'ÉTUDE DES MÉCANISMES DE LA REPRODUCTION SEXUÉE CHEZ LES VÉGÉTAUX .....	1
1.1.1 LE CYCLE VITAL CHEZ LES ANGIOSPERMES .....	2
1.1.2 Anatomie de l'organe reproducteur femelle .....	2
1.1.3 Pollinisation et croissance des tubes polliniques.....	3
1.1.4 Fécondation .....	4
1.1.5 Formation du fruit et des graines.....	5
1.2 LES BASES MOLÉCULAIRES: LES VOIES DE TRANSDUCTION DE SIGNAUX .....	7
1.2.1 Les récepteurs membranaires .....	9
1.2.2 Les protéines de transduction de signaux liant le GTP.....	12
1.2.3 Les effecteurs des protéines G et les seconds messagers qui leurs sont associés.....	15
1.2.4 La calmoduline et autres protéines liant le calcium .....	17
1.2.5 Les protéines kinases .....	18
1.2.5.1 Le groupe "AGC" .....	22
1.2.5.2 Le groupe "CaMK" .....	23
1.2.5.3 Le groupe "CMGC" .....	25
1.2.5.4 Le groupe RLK.....	31

1.3 PROJET DE RECHERCHE .....	35
<b>2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>36</b>
2.1 MATÉRIEL.....	36
2.2 MÉTHODES.....	37
2.2.1 <i>Protocole d'extraction des ARN</i> .....	37
2.2.2 <i>Dosage des ARN totaux</i> .....	38
2.2.3 <i>Purification d'ARNm</i> .....	39
2.2.4 <i>Dosage des ARNm</i> .....	39
2.2.5 <i>Construction de la banque d'ADNc</i> .....	39
2.2.6 <i>Criblage de la banque d'expression</i> .....	40
2.2.7 <i>Essai kinase sur membrane de nitrocellulose</i> .....	41
2.2.8 <i>Extraction de protéines (fraction particulaire)</i> .....	42
2.2.9 <i>Dosage des protéines</i> .....	43
2.2.10 <i>Essai kinase en gel</i> .....	43
2.2.11 <i>Analyse des acides aminés phosphorylés</i> .....	45
2.2.12 <i>Marquage métabolique</i> .....	47
2.2.13 <i>Extraction des protéines marquées</i> .....	48
2.2.14 <i>Traduction In Vitro</i> .....	48
2.2.15 <i>Électrophorèse bi-dimensionnelle</i> .....	48
2.2.15.1 <i>Électrophorèse sur gel à gradient de pH non-équilibré (NEPHGE)</i> ...	49
2.2.15.2 <i>Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes</i> .....	50
2.2.15.3 <i>Traitements post-électrophorèse</i> .....	51
2.2.16 <i>Visualisation des tubes polliniques au bleu d'aniline</i> .....	51
2.2.16.1 <i>Préparation de la solution de bleu d'aniline</i> .....	52
<b>3.0 RÉSULTATS.....</b>	<b>53</b>
3.1 CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES .....	53
3.2 MARQUAGE MÉTABOLIQUE .....	54
3.3 ANALYSE DES PROTÉINES TRADUITES <i>IN VITRO</i> PAR.....	55

ÉLECTROPHORÈSE BI-DIMENSIONNELLE .....	55
3.4 ESSAIS KINASE EN GEL .....	59
3.4.1 <i>Autophosphorylation</i> .....	61
3.4.2 <i>Histone H1</i> .....	63
3.4.3 <i>Protéine basique de la myéline (MBP)</i> .....	65
3.4.4 <i>Caséine</i> .....	67
3.5 ANALYSE DES ACIDES AMINÉS PHOSPHORYLÉS .....	69
3.6 CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNC .....	71
3.7 CRIBLAGE FONCTIONNEL .....	72
<b>4.0 DISCUSSION .....</b>	<b>74</b>
4.1 CHOIX D'UN INTERVALLE DE TEMPS SUIVANT LA POLLINISATION .....	74
4.2 ÉVALUATION DE LA POSSIBILITÉ DE DÉTECTER DES PROTÉINES NÉOSYNTHÉTISÉES AU COURS DE L'INTERVALLE DE TEMPS ÉTUDIÉ.....	75
4.3 AUGMENTATION DE LA RÉOLUTION DES BANDES DE PROTÉINES PAR ÉLECTROPHORÈSE BI-DIMENSIONNELLE .....	76
4.4 DÉTECTION D'ACTIVITÉ DE PHOSPHORYLATION AU NIVEAU DES OVAIRES.....	77
4.5 MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE CRIBLAGE FONCTIONNEL PAR ESSAI KINASE .....	78
<b>5.0 CONCLUSION .....</b>	<b>81</b>
<b>6.0 RÉFÉRENCES.....</b>	<b>83</b>

# Liste des tableaux

---

**Tableau I:** Rendement moyen obtenu lors des réactions  
de traduction *in vitro* .....56

**Tableau II:** Rendements moyens obtenus lors  
de la purification d'ARNm .....71

# Liste des figures

---

<b>Figure 1:</b> Représentation schématique d'un sac embryonnaire ainsi que d'un ovule typique chez les plantes supérieures.....	3
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique des principales voies de transduction de signaux utilisées dans le règne animal.....	8
<b>Figure 3:</b> Relation existant entre les différents effecteurs des protéines G, les seconds messagers et les protéines kinases qui en sont dépendantes.....	15
<b>Figure 4:</b> Classification des protéines kinases retrouvées chez les plantes.....	21
<b>Figure 5:</b> Croissance des tubes polliniques de <i>S. chacoense</i> observée par microscopie à épifluorescence.....	53
<b>Figure 6:</b> Marquage métabolique des protéines néosynthétisées à différents intervalles de temps suivant la pollinisation.....	54
<b>Figure 7:</b> Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle, des protéines traduites in vitro.....	57
<b>Figure 8:</b> Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et associées à la membrane, de carpelle de <i>S. chacoense</i> , tel que déterminé par un essai kinase en gel sans substrat ajouté.....	62

- Figure 9:** Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et associées à la membrane, de carpelle de *S. chacoense* tel que déterminé par un essai kinase en gel en utilisant l'histone H1 comme substrat.....64
- Figure 10:** Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et membranaires de carpelle de *S. chacoense* tel que déterminé par un essai kinase en gel en ajoutant le substrat MBP.....66
- Figure 11:** Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et membranaires de carpelle de *S. chacoense* tel que déterminé par un essai kinase en gel en ajoutant le substrat caséine.....68
- Figure 12:** Analyse des acides aminés phosphorylés suite à un essai kinase in vitro.....70
- Figure 13:** Exemple de résultats obtenus lors des criblages fonctionnels primaires et secondaires.....73

# Liste des abréviations

---

ACC	Acide-1-carboxilique-1-aminocyclopropane
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CaM	Calmoduline
CDK	<i>Cyclin-dependant protein kinase</i> (protéine kinase dépendante des cyclines)
CKII	Caséine kinase II
cpm	Coups par minute
DAG	Diacylglycérol
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i> (kinase-3 de la glycogène synthase)
GTP	Guanosine triphosphate
GDP	Guanosine diphosphate
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HCl	Acide chlorhydrique
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphate
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i> (Motif de répétition riche en leucine)
MAP	<i>Mitogen activated protein</i> (Protéine activée par les mitogènes)

MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (Protéine kinase activée par les mitogènes)
MAP2K	MAP kinase kinase
MAP3K	MAP kinase kinase kinase
ml	Mililitre
Min	Minute
M	Molaire
mM	Milimolaire
mm	Millimètre
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NEPHGE	Non-Equilibrium pH Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel à pH non-équilibré)
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pH	Potentiel hydrogène
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
p/v	Unité de masse par unité de volume
RLK	<i>Receptor-like kinase</i> (Kinase de type récepteur)
RSK	Récepteur kinase du domaine S d'autoincompatibilité
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyleéthylènediamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
V	Volt
v/v	Unité de volume par unité de volume

# Remerciements

---

Plusieurs personnes ont contribué à la réalisation de ce projet de recherche, que ce soit par leur support technique, matériel ou moral, leurs conseils ou leurs encouragements. Je ne peux vous nommer tous mais sachez que votre participation a été appréciée au plus haut point.

Je tiens à remercier spécialement les Professeurs David Morse, Vince De Luca, Mario Cappadoccia et Deep Saïni pour m'avoir généreusement permis d'utiliser leur équipement.

Je tiens également à remercier sincèrement mon directeur de maîtrise, Daniel Matton, pour ses conseils, ses idées et sa patience.

Enfin, un gros merci à tous les étudiants, professeurs ainsi qu'au personnel de soutien qui ont su par leur effort, leur participation ou simplement leur sourire, rendre l'atmosphère de l'IRBV agréable et détendu.

# 1.0 Introduction

---

## 1.1 Intérêt de l'étude des mécanismes de la reproduction sexuée chez les végétaux

Au cours des dernières années, un intérêt croissant a été porté à l'étude des mécanismes de la reproduction sexuée chez les végétaux. Les outils de la biologie moléculaire nous permettent maintenant d'aller scruter en profondeur les molécules impliquées au niveau du développement embryonnaire et de la formation du fruit. La compréhension des mécanismes moléculaires régissant la reproduction sexuée chez les plantes supérieures est d'une grande importance tant au niveau fondamental, qu'appliqué. Avec la croissance de la population mondiale et la recherche constante de produits alimentaires de meilleure qualité, l'amélioration des plantes par la voie des biotechnologies est devenue un sujet chaud. Pour pouvoir envisager l'amélioration d'un fruit, que ce soit au niveau du temps requis pour sa maturation, de sa saveur, de son apparence ou de sa durée de conservation, ainsi que de l'augmentation de la quantité de fruits produits, la connaissance des mécanismes régissant la reproduction chez les végétaux devient un atout considérable.

Il est impossible de parler de reproduction sans connaître au préalable l'anatomie des organes de reproduction ainsi que leurs différents rôles. Nous commencerons donc par un bref rappel, en portant notre attention sur les angiospermes (du grec *angeion*, vase ou boîte et de *sperma*, graine) qui sont par définition un sous-embranchement de plantes qui produisent des graines enfermées dans un fruit ; soit le centre de notre intérêt (Roland, J.-C. et Roland, F. 1983).

### 1.1.1 Le cycle vital chez les angiospermes

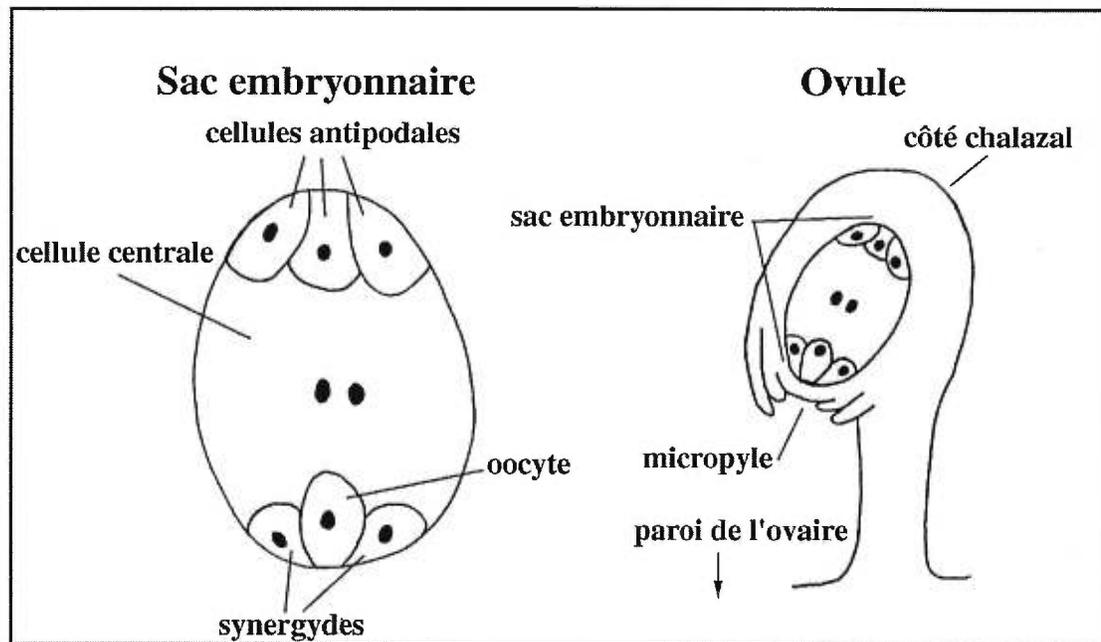
Au cours de leur développement, les organismes végétaux alternent entre une phase multicellulaire haploïde appelée gamétophyte et une phase multicellulaire diploïde appelée sporophyte. Le principal rôle des gamétophytes mâle et femelle est de produire les gamètes haploïdes qui serviront lors de la reproduction. La fusion de l'oosphère et du gamète mâle permet la croissance du sporophyte qui, par méiose, produit des spores haploïdes. La prolifération et la différenciation cellulaire qui s'en suivent donnent lieu à l'apparition des gamétophytes haploïdes mâle et femelle. (Raven P.H. *et al.*, 1992).

### 1.1.2 Anatomie de l'organe reproducteur femelle

La plupart des fleurs étant hermaphrodites, elles possèdent une partie femelle et une partie mâle. La partie fertile femelle d'une fleur est appelée carpelle ou pistil. Elle comporte une base renflée, l'ovaire, qui contient les ovules et une partie supérieure mince et allongée, le style, qui est coiffé du stigmate. Le stigmate de plusieurs plantes est couvert de papilles qui sécrètent un fluide chimiquement complexe, composé entre autres d'huile, de sucre et d'acides aminés, tel que démontré chez le pétunia (Konar, R.N. et Linskens, H.F. 1966 a et b). Ce fluide permettra au pollen d'adhérer au stigmate, de s'hydrater et de germer (Heslop-Harrison, J. 1987). Il est à noter que le mot pistil est également employé par certains auteurs pour désigner l'ensemble des carpelles d'une fleur ou d'une inflorescence.

Tel que mentionné plus haut, l'étendue du gamétophyte femelle est très réduite. Il est restreint au simple sac embryonnaire qui se développe à l'intérieur de l'ovule. Le sac embryonnaire est aussi appelé mégagamétophyte. La forme la plus courante du sac embryonnaire, appelée forme *Polygonum*, est composée de trois cellules antipodales, d'une cellule centrale comportant deux noyaux dits noyaux polaires, et d'une oosphère bordée de deux cellules synergides. Le mégagamétophyte est donc couramment

composé de seulement 7 cellules qui s'organisent selon un axe de polarité bien précis dans l'ovule: les cellules antipodales sont situées au pôle chalazal alors que les synergides et l'oosphère sont situées du côté du micropyle. Le micropyle est l'endroit où les téguments forment un pore, alors que le côté dit chalazal est du côté du funicule qui fixe l'ovule contre le placenta de l'ovaire.



**Figure 1:** Représentation schématique d'un sac embryonnaire ainsi que d'un ovule typique chez les plantes supérieures.

### 1.1.3 Pollinisation et croissance des tubes polliniques

Chez les angiospermes, la reproduction sexuée débute lorsqu'un grain de pollen provenant d'une anthère est déposé à la surface du stigmate. Le grain de pollen, qui est le gamétophyte mâle, germe pour donner lieu à la croissance d'un tube pollinique qui se forme à partir du noyau végétatif. Les tubes polliniques croissent dans un espace intercellulaire (Jenson et Fischer, 1969) de fluide nutritif (Cresti *et al.*, 1976) entraînant dans leur course les deux gamètes mâles vers l'ovaire. Les mécanismes moléculaires permettant la croissance dirigée du tube pollinique vers l'ovaire sont peu

connus. Cependant, il a récemment été démontré qu'une glycoprotéine (TTS), spécifique aux tissus transmetteurs du style, exerce une attraction sur les tubes polliniques en croissance, en formant un gradient de sucre dans le style (Wu, H.M. et al. 1995; Cheung, A.Y. et al. 1995). Le gradient de sucre croissant vers l'ovaire pourrait servir de nutriments et de signal pour la croissance directionnelle des tubes polliniques.

D'autre part, l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la croissance des tubes polliniques est établie depuis longtemps, cependant, son rôle exact n'est pas connu. En effet, dès 1963 il a été démontré que la présence de calcium dans le milieu de croissance est nécessaire à la germination du pollen et à la croissance des tubes polliniques (Brewbaker, J.L. et Kwack, B.H., 1963). Des études *in vitro* ont également démontré qu'il existe un gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  croissant vers l'extrémité du tube pollinique de *Lilium longiflorum* (Jaffe, L.A. et al. 1975, Miller, D.D. et al. 1992 et Rathore, K.S. et al. 1991) et que l'utilisation de tampon pour éliminer ce gradient arrête la croissance des tubes pollinique (Pierson, E.S. et al. 1994 et Miller D.D. et al. 1992). L'utilisation de l'ion inorganique  $\text{La}^{3+}$ , un bloquant des canaux calciques, interrompt également la croissance des tubes polliniques (Picton, J.M. et Steer, M.W., 1985). Ces résultats restent toutefois à être confirmés *in vivo*.

### 1.1.4 Fécondation

Dans la plupart des cas, le tube pollinique, avec en tête les deux noyaux génératifs mâles, pénètre dans l'ovule par le micropyle et traverse une cellule synergide avant de livrer les gamètes mâles. Ceux-ci vont effectuer la double fécondation de l'oosphère et de la cellule centrale. Une fois fécondée, l'oosphère forme le zygote principal qui deviendra l'embryon alors que la cellule centrale forme un zygote accessoire triploïde qui deviendra l'albumen, un tissu nourricier.

Au cours des dernières années, deux principaux modèles, permettant d'expliquer la croissance dirigée des tubes polliniques vers les ovules, ont été proposés: le modèle

mécanique et le modèle chémotropique. Selon le modèle mécanique, la croissance dirigée serait purement due aux caractéristiques architecturales et aux molécules d'adhérence des tissus transmetteurs du style (telles les vitronectines chez les animaux), alors que selon le modèle chémotropique l'ovule émettrait un signal chimique pour diriger le tube pollinique.

Des études récentes semblent démontrer que chez *Arabidopsis*, les ovules émettent des signaux permettant de guider les tubes polliniques vers eux (voir Wilhelmi, L.K., Preuss, D. 1997 pour une revue sur la croissance dirigée des tubes polliniques.). En effet, il a été observé que les tubes polliniques migrent souvent tout droit au plus proche ovule, comme si le tube pollinique pouvait "sentir" l'ovule. De plus, chez quatre différents mutants sporophytiques récessifs à stérilité femelle (bel1, sin1, 47H4 et 54D12) présentant un sac embryonnaire incomplet, les tubes polliniques ne semblent plus être guidés. L'exemple le plus marquant de cette situation survient lorsque les ovules n'ont pas du tout de sac embryonnaire (sin1 et 47H4) (Hülkamp, M. et al. 1995).

Une autre observation intéressante a été faite chez *Arabidopsis*. Il semble qu'un mécanisme de répulsion entre les tubes polliniques ayant atteint leur cible permette d'éviter que plus d'un tube pollinique ne pénètre le même ovule (Wilhelmi, L.K. et Preuss, D. 1996).

### **1.1.5 Formation du fruit et des graines**

Suite à la fécondation, des gènes spécifiques déclenchent la formation des graines à partir des ovules et la transformation de l'ovaire en fruit. Les téguments se transforment en enveloppe pour la graine. Le zygote principal subit des segmentations successives qui permettent, en bout de ligne, de faire ressortir les premières ébauches d'embryon. Le zygote accessoire se transforme, en se divisant, en une masse de cellules inorganisées que l'on appelle albumen et qui servira de tissu nourricier. Il semblerait que des mécanismes différents contrôlent l'initiation de ces deux processus.

En effet, un groupe de chercheurs a isolé un mutant d'*Arabidopsis* nommé *fie* (*Fertilization-Independent Endosperm*) pour lequel ils ont observé un développement de l'albumen indépendant de la fécondation. Toutefois, l'initiation de l'embryogenèse n'est pas observée chez ce mutant ; ce qui suggère que les mécanismes d'initiation de l'embryogenèse et du développement de l'albumen sont différents (Ohad, N. et al. 1996).

La maturation de la graine est une phase intense d'accumulation de réserves nutritives dans l'albumen. On observe une déshydratation active du protoplasme et la disparition des vacuoles. Cette forte déshydratation s'accompagne d'un ralentissement des activités physiologiques, telle la respiration. Le carpelle, quant à lui, poursuit son accroissement. Les cellules qui le composent peuvent soit devenir ligneuses et donner lieu à ce que l'on appelle un fruit sec où se gorgent d'eau et former une pulpe caractéristique des fruits de type charnus. (Voir Olsen, R.A. 1988 pour une étude plus détaillée de la formation du fruit chez *Solanum tuberosum*.)

Trois mutants d'*Arabidopsis*, *fis* 1, 2 et 3 (*fis* pour *Fertilization-Independent Seed*), pour lesquels les premières étapes du développement de la graine sont amorcées sans fécondation requise, ont été isolés récemment. Chez ces mutants, le développement de l'albumen et de l'embryon n'est cependant pas complété et les graines ne parviennent pas à maturité. Les produits des gènes impliqués dans ces mutations ne sont pas connus, mais les auteurs proposent un rôle de régulateurs négatifs pour ces gènes qui interviendraient lors des premières étapes amorçant le développement de la graine (Chaudhury, A.M. et al. 1997).

Un autre mutant isolé chez *Arabidopsis* présente un défaut au niveau de la formation des graines, cependant cette fois la mutation affecte l'embryogenèse. Les embryons provenant d'ovules affectés par la mutation *mea* (MEDEA) croissent de façon excessive et meurent durant la période de dessiccation de la graine. Le gène portant cette mutation serait un gène de type "Polycomb", un groupe de gènes retrouvé chez les animaux et qui code pour des protéines assurant la stabilité des patrons

d'expression d'autres gènes au cours de phases de division intense et régulant également le contrôle de la prolifération cellulaire (Grossniklaus, U. et al. 1998).

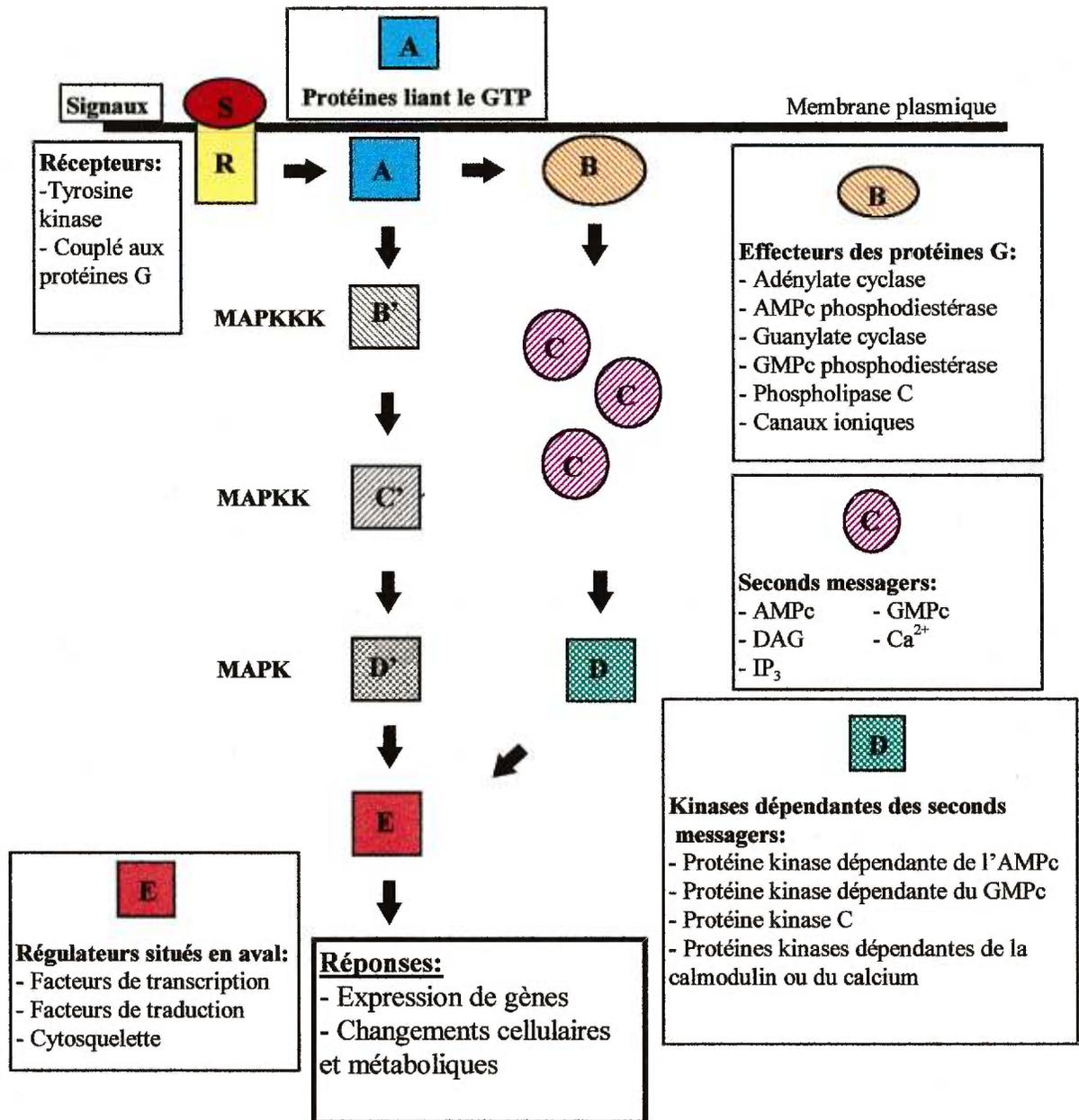
## **1.2 Les bases moléculaires: les voies de transduction de signaux**

Bien que l'étude de l'embryogenèse chez les angiospermes date d'au moins une centaine d'années, les connaissances que nous avons sont surtout descriptives. Les bases moléculaires qui se cachent derrière la fécondation, le contrôle des premières divisions mitotiques du zygote, l'activation des gènes nécessaire à la prolifération et à la différenciation cellulaire, sont très peu connues. Les recherches entreprises dans ce domaine en sont encore à leurs tous premiers pas chez les plantes.

Certains indices peuvent quand même être tirés des recherches effectuées chez d'autres organismes eucaryotes. Nous savons déjà que certains mécanismes de régulation de l'activité cellulaire en réponse à des signaux extracellulaires spécifiques sont incroyablement bien conservés à travers les espèces. On peut dire que ce sont pratiquement des mécanismes universels. Ces mécanismes que l'on appelle voie de transduction de signaux impliquent habituellement des cascades d'acheminement qui permettent l'intégration et l'amplification des différents signaux reçus par la cellule. Des études récentes tendent à démontrer que plusieurs molécules de signalisation bien connues chez d'autres organismes eucaryotes seraient aussi présentes chez les plantes et pourraient y jouer des rôles similaires.

La plupart des connaissances que nous avons des voies de transduction de signaux nous viennent d'études chez la levure de même que d'études de systèmes modèles animaux aussi différents que la drosophile, *C. elegans*, *Xenopus* et des lignées de cellules mammifères. Bien que le but présent soit de parler des voies de transduction chez les plantes, il serait bon de commencer par revoir les connaissances que nous avons chez les animaux puisque ces connaissances sont bien établies. Ces connaissances peuvent être brièvement résumées par la figure 2.

## Les principales voies de transduction de signaux



**Figure 2:** Représentation schématisée des principales voies de transduction de signaux utilisées dans le règne animal.

Un signal, pouvant prendre des formes variées telles que: des hormones peptidiques ou chimiques (e.g. les phytohormones), des changements d'intensité lumineuse ou de température, une dépolarisation électrique, une molécule gazeuse (e.g. l'oxyde nitrique chez les cellules mammifères et l'éthylène chez les plantes) différents lipides ou stéroïdes, est perçu par un récepteur. Deux principaux types de récepteur extracellulaire sont caractérisés: les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs tyrosine kinase (TRK) (pour une revue sur les TRK voir van der Geer, P., Hunter, T. et Lindberg, R.A. 1994). La stimulation du récepteur mènera à l'activation de protéines liant le GTP (*GTP binding protein*). À partir des protéines liant le GTP, deux voies sont possibles: l'activation d'une cascade de MAP kinase (*Mitogen Activated Protein*) ou l'activation d'un effecteur. Un effecteur peut prendre la forme d'un canal ionique ou d'un enzyme qui est responsable du contrôle du niveau intracellulaire d'un second messenger comme le  $Ca^{2+}$ , le diacylglycérol (DAG), l'inositoltriphosphate ( $IP_3$ ), l'AMPc et le GMPc. Ces seconds messagers modulent l'activité de protéines kinases ou phosphatases spécifiques qui sont dépendantes d'un second messenger. Les deux voies d'activation de kinases mènent toutes deux à l'activation de régulateurs qui contrôlent l'expression de gènes spécifiques.

Évidemment ce résumé n'illustre pas les diverses exceptions possibles à la règle, mais donne plutôt une idée générale des principales voies de transduction de signaux pouvant être utilisées par une cellule typique. Maintenant qu'en est-il chez les plantes ? Les prochaines pages sont consacrées à la revue des différents composants des voies de transduction connues au niveau des plantes supérieures.

### **1.2.1 Les récepteurs membranaires**

À coup sûr les plantes reçoivent, elles aussi, des messages extracellulaires. Elles doivent donc posséder des récepteurs pour les capter. L'existence de récepteurs membranaires chez les plantes a longtemps été discutée parce que l'on croyait que la paroi cellulaire des plantes empêchait ce type de signalisation. On sait maintenant que

plusieurs protéines ayant les caractéristiques de récepteurs se retrouvent chez les plantes.

Les phytochromes, des photorécepteurs cytoplasmiques en sont un bon exemple. Cependant, aucune évidence ne permet d'affirmer qu'ils utilisent, en une quelconque occasion, les membranes comme support (pour des revues voir Quail, P.H. 1991 et Furuya, M. 1993).

Un possible système de perception de l'éthylène a été cloné, mais il a beaucoup plus d'homologie avec le système à deux composants bactérien (Parkinson, J.S. 1993), qu'avec un récepteur typiquement retrouvé chez les animaux (e.g.: récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G ou récepteurs tyrosine kinase) (Chang, C. et al. 1993). Il en est de même pour la cytokinine, une hormone végétale impliquée, entre autres, au niveau de la division cellulaire. Un groupe de chercheurs a isolé un clone, CK11, codant pour une protéine similaire aux régulateurs du système à deux composants et qui est possiblement le récepteur des cytokinines (Kakimoto, T. 1996).

Un clone nommé BRI1, qui pourrait bien être le récepteur pour les brassinostéroïdes, a également été isolé chez un mutant d'*Arabidopsis* qui est insensible aux brassinostéroïdes. Toutefois, aucune évidence n'est encore venue confirmer que le produit du gène BRI1 peut lier directement les brassinostéroïdes. L'hypothèse voulant que BRI1 soit plutôt un intermédiaire entre un récepteur extracellulaire et le milieu intracellulaire n'est toujours pas écartée (Li, J. et Chory, J. 1997).

Plusieurs autres hormones végétales sont connues: L'acide abscisique, l'auxine, l'acide salicylique. Cependant, leurs récepteurs restent toujours à identifier (Pour une revue voir Bowler, C. et Chua, N.H. 1994).

D'autre part, une nouvelle classe de récepteurs membranaires, que l'on appelle les RLK pour *Receptor-Like Kinase*, a été découverte chez les plantes. Ce sont des

récepteurs qui ressemblent, par leur structure, aux récepteurs des facteurs de croissance des animaux. Cependant, contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, les RLK présentent une activité Ser/Thr kinase et non tyrosine kinase. Ils possèdent un domaine extracytoplasmique et font un seul passage transmembranaire qui est suivi d'un domaine kinase intracellulaire (Walker, J.C. 1994). Depuis que le premier membre de cette classe, ZmPK1, a été identifié chez le maïs (Walker, J.C. et Zhang, R. 1990), plusieurs autres membres ont été découverts chez *Arabidopsis* et *Brassica* (Valon, C. et al. 1993; Walker, J.C. 1993; Tobias, C.M., Howlett, B. et Nasrallah, J.B. 1992; Chang, C. et al. 1992; Kohorn, B.D., Lane, S. et Smith, T.A., 1992; Goring, D.R. et Rothstein, S.J. 1992; Stein, J.C. et al. 1991). Les RLK ont été subdivisés, selon la nature de leur domaine extracellulaire, en trois catégories: ceux qui ont un domaine extracellulaire de type S (homologie avec la glycoprotéine SLG du locus d'autoincompatibilité des *Brassicaceae*), ceux qui possèdent un domaine extracellulaire de répétition riche en leucine (LRR pour *Leucine-Rich Repeat*), enfin, la troisième catégorie ne comporte qu'un seul membre jusqu'à présent: Pro25 (Kohorn, B.D. et al. 1992). Pro25 possède dans son domaine extracellulaire deux répétitions d'un motif homologue au facteur de croissance épidermique (EGF pour *Epidermal Growth Factor*).

Le fait que cette nouvelle classe de récepteur possède différents types de domaines extracellulaires semble démontrer qu'ils interagissent avec des ligands spécifiques et peuvent donc répondre à des demandes physiologiques différentes. Cependant, avant de pouvoir parler de découverte d'une voie de transduction de signaux, il reste encore à identifier ces fameux ligands ainsi que les composantes intracellulaires reliées au récepteur et qui lui permettent de transporter le signal. Il pourrait être intéressant d'émettre des hypothèses sur la nature des ligands de ces récepteurs ainsi que sur leur fonctionnement. Ont-ils des polypeptides comme ligands à l'instar des récepteurs des facteurs de croissances auxquels ils sont homologues?

Un modèle préliminaire d'une voie de transduction de signaux a été proposé pour 2 gènes trouvés chez *Arabidopsis*. Clavata1 (Clv1) est un récepteur kinase de type RLK

possédant un domaine LRR et Clavata3 (Clv3) est un polypeptide de fonction inconnue. Il a été proposé que Clv1 serait présent chez *Arabidopsis* sous forme d'un hétérodimère inactif et que Clv3 permettrait l'assemblage d'un complexe actif comprenant une protéine phosphatase, KAPP, qui agirait comme régulateur négatif et d'une GTPase Rho (Fletcher, J.C. et al, 1999 et Trotochaud, A.E. et al. 1999).

La capacité d'interagir avec d'autres protéines démontrée par les motifs LRR (Schneider, R. et Schweiger, M. 1991; Kobe, B. et Deisenhofer, J. 1993 et 1994) et EGF (Davis, C.G. 1990; Siegelman, M.H. et al. 1990) semble être en faveur de ce modèle. Peut-être les motifs LRR servent-ils également à promouvoir la dimérisation des récepteurs tels que le font les récepteurs des facteurs de croissance ? Bien que ces résultats soient un point de départ intéressant, comme on peut le voir, il reste encore beaucoup de travail à faire.

Globalement, le fait que pratiquement aucun récepteur, tel qu'ils sont connus chez d'autres organismes (e. g. récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G, récepteurs tyrosine kinase) n'ait été trouvé chez les plantes et la découverte d'un système à deux composants similaire à celui retrouvé chez les bactéries ainsi que la découverte de cette nouvelle classe de récepteur (RLK), laisse entrevoir que la recherche sur les voies de transduction de signaux chez les plantes risque d'apporter son lot de surprises et de nouveautés.

### **1.2.2 Les protéines de transduction de signaux liant le GTP**

Les protéines liant le GTP font partie d'un vaste groupe de protéines de régulation qui sont structurellement liées mais aux fonctions très diversifiées. Elles sont divisées principalement en deux groupes: les protéines G (protéines hétérotrimériques comportant les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et les petites protéines liant le GTP (principalement divisés en trois familles: Rho, Ras et Rab/Ypt). L'un des rôles les plus marquants des protéines liant le GTP est celui de commutateur moléculaire

(*molecular switch*) au niveau des voies de transduction de signaux. La voie est active lorsque le commutateur lie le GTP et devient inactive lorsque le GTP est hydrolysé en GDP.

Des études utilisant des agonistes (toxine du choléra<sup>1</sup>, GTP $\gamma$ S<sup>2</sup>) et antagonistes (GDP $\beta$ S<sup>3</sup> et la toxine pertussis) des protéines liant le GTP ont permis de démontrer que les protéines G sont impliquées, chez les plantes, dans le contrôle de l'ouverture de canaux potassium (Farley-Grenot, K. et Assman, S.M. 1991; Li, W. et Assman, S.M. 1993) ainsi qu'au niveau de la réponse à des variations d'intensité lumineuse (Neuhaus, G. et al. 1993; Romero, L.C. et Lam, E. 1993; Warpeha, K.M.F. et al. 1991).

Plusieurs homologues des protéines G ont maintenant été clonés chez les plantes. Notons entre autres: des homologues de la sous-unité  $\alpha$  chez *Arabidopsis* (GPA1) et chez la tomate (TGA1) (Ma et al. 1990, 1991) de mêmes que des homologues de la sous-unité  $\beta$  chez *Arabidopsis* (AGB1) et chez le maïs (ZGB1) (Weiss, C.A. et al., 1994). Aucune sous-unité  $\gamma$  n'a été cloné chez les plantes supérieures à ce jour.

Des homologues des petites protéines liant le GTP, Rho et Rab, ont été identifiés chez les plantes supérieures tant au niveau de la protéine que du gène ou de l'ADNc (Yang, Z. et Watson, J.C., 1993; Verma et al., 1994; Terryn et al., 1993).

Le premier homologue de Rho (Rop1Ps) a été identifié chez le pois (Yang, Z. et Watson, J.C., 1993). Rop1Ps possède des domaines conservés de liaison au GTP/GDP

---

<sup>1</sup> Les toxines du choléra et pertussis perturbent l'activité des protéines liant le GTP en ajoutant un groupement ADP-ribose provenant d'un groupement NAD sur la sous-unité  $\alpha$  des protéines liant le GTP.

<sup>2</sup> Analogue du GTP connu pour se lier de façon irréversible aux protéines liant le GTP, bloquant donc celle-ci en forme active (agonisme).

<sup>3</sup> Analogue du GDP connu pour se lier de façon irréversible aux protéines liant le GTP, bloquant donc celle-ci en état inactive (antagonisme).

et d'activité GTPase, un site d'isoprénylation post-traductionnelle<sup>4</sup>, ainsi qu'un site consensus de liaison à l'effecteur. Le degré de conservation du domaine de liaison à l'effecteur de Rop1Ps porte à croire que les effecteurs des protéines de type Rho sont également bien conservés chez les plantes. Rop1Ps est codé par une famille à gènes multiples comportant au moins six isogènes.

Les protéines de la famille Rho sont reconnues pour jouer un rôle au niveau de l'organisation du cytosquelette (Paterson, H.F. et al., 1990). Les plantes possèdent une diversité unique dans l'arrangement de ses filaments d'actine qui vari selon le type de cellule ainsi que selon le stade du cycle cellulaire. Des analyses phylogéniques ont démontré que les plantes ont conservé dans leur évolution une sous-famille du gène Rho qui leur est propre (Yang, Z., 1996).

Ceci et la présence de plusieurs isogènes de Rho chez les plantes pourrait refléter l'implication de Rho au niveau de la formation des différents arrangements de filaments d'actine. Des analyses par Western blot ont démontré, qu'au niveau des fleurs du pois, Rop1ps est plus abondant dans les anthères et les styles pollinisés. De plus, des études par immunofluorescences indirectes, utilisant un anticorps anti-Rop1Ps, ont démontré que Rho est localisé préférentiellement au niveau de l'apex des tubes polliniques en croissance. Ceci suggère une implication possible de Rho au niveau de la régulation, dépendante de l'actine, de la croissance du tube pollinique (Yang, Z., 1996).

Plusieurs membres de la famille Rab/Ypt ont été retrouvés en association avec des vésicules de transport, sur le réticulum endoplasmique ou sur l'appareil de Golgi de divers organismes. On soupçonne donc un rôle au niveau du transport intracellulaire

---

<sup>4</sup> Attachement covalent d'un groupement isoprényl: farnesyl ou geranylgeranyl, qui contribue à l'association de la protéine à la membrane en augmentant son hydrophobicité en plus d'être nécessaire à l'interaction de la protéine avec le récepteur couplé aux protéines G ainsi qu'avec les régulateurs de Ras (Kisselev et al., 1994; Orita et al., 1993).

et au niveau de la sécrétion pour la famille Rab/Ypt (Zerial, M. et Stenmark, H., 1993; Balch, W.E., 1990).

Les membres de la famille Ras sont surtout impliqués au niveau de la croissance et de la différenciation cellulaire (Hall, A., 1990). Cependant, aucun homologue de Ras n'a été identifié jusqu'à présent chez les plantes supérieures.

### 1.2.3 Les effecteurs des protéines G et les seconds messagers qui leurs sont associés

Les connaissances nous venant de l'étude de cellules animales permettent de diviser les effecteurs des protéines G principalement en trois catégories: les canaux ioniques, les phospholipases et les enzymes qui métabolisent les nucléotides cycliques. La figure 3 montre la relation qui existe entre les différents types d'effecteurs de seconds messagers et les protéines kinases qui y sont reliés.

Effecteur	Second messenger	Protéine kinase dépendante du second messenger
Adénylate cyclase AMPc phosphodiesterase	AMPc	Kinase dépendante de l'AMPc
Guanylate cyclase GMPc phosphodiesterase	GMPc	Kinase dépendante du GMPc
Phospholipase C	DAG IP <sub>3</sub>	Protéine kinase C
Canaux ioniques	Ca <sup>2+</sup>	Kinase dépendante de la CaM Kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup>

**Figure 3:** Relation existant entre les différents effecteurs des protéines G, les seconds messagers et les protéines kinases qui en sont dépendantes.

Tel que mentionné précédemment, des études par "*patch clamp technique*" sur des protoplastes à l'aide d'agonistes et d'antagonistes ont été utilisées pour étudier les protéines G. Ces études ont permis de démontrer que les flux d'ion potassium ( $K^+$ ) entrant et sortant au niveau des cellules de gardes et des cellules du mésophylle respectivement, sont régulés par les protéines G (Farley-Grenot, K. et Assmann, S.M., 1991; Li, W. et Assmann, S.M. 1993). Il n'est cependant pas clair si ces canaux ioniques sont directement des effecteurs des protéines G ou s'ils sont indirectement régulés par d'autres seconds messagers.

La phospholipase C (PLC) est un enzyme qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et inositoltriphosphate ( $IP_3$ ). Ces deux composés jouent un rôle très important au niveau des voies de signalisation: DAG est bien connu comme activateur des protéines kinases C (PKC) (Bell, R.M., 1986) alors que l' $IP_3$  est un second messenger qui permet de libérer les réserves intracellulaires d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) (Berridge, M.J. et Irvine, R.F., 1984). L'existence d'activité pouvant être attribuée à la PLC a été documentée chez les plantes par Côté et Crain (Côté, G.G. et Crain, R.C., 1993). Selon ces derniers, l'activité de PLC a été détectée entre autres au niveau des racines, de la tige, du pollen et des inflorescences d'un certain nombre d'angiospermes. L'activité observée se retrouve tant au niveau des fractions solubles que particulières, ce qui semble indiquer que chez les angiospermes tout comme chez les animaux, la PLC se retrouve sous forme soluble ainsi qu'associée à la membrane.

Les effecteurs des protéines liant le GTP les plus courants sont ceux qui permettent de varier la quantité d'AMPc et de GMPc intracellulaire (adénylate ou guanylate cyclase ainsi que phosphodiesterase des nucléotides cycliques). L'AMPc est un second messenger particulièrement important, qui est présent, chez les animaux, dans pratiquement tous les types de cellules et est utilisé pour réguler toute une gamme de processus cellulaires.

L'AMPC, l'adénylate cyclase ainsi que l'AMPC phosphodiesterase ont été détectées chez des plantes supérieures (Carricarte, V.C. et al. 1988; Lusini, P. et al. 1991), cependant, on en connaît encore très peu sur leur rôle chez ces végétaux.

Une protéine kinase ayant des propriétés similaires à une protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA), présente chez les animaux, a aussi été trouvée chez le pétunia (Polya, G.M. et al., 1991). Cette protéine kinase phosphoryle le substrat Kemptide, un substrat synthétique utilisé par les protéines kinases dépendantes de l'AMPC retrouvée chez les mammifères. De plus, l'activité kinase de cette protéine est inhibée par la sous-unité régulatrice des protéines kinases AMPC-dépendante de cœur de bœuf et ce, de façon réversible par l'AMPC.

Le rôle du GMPc chez les plantes supérieures a été mis en évidence par les travaux de Bowler et al. (1994). En utilisant eu aussi la technique de microinjection, ils sont parvenus à démontrer que le GMPc permet la synthèse d'anthocyane au niveau des cellules de tomates de type mutant *aureus*. La biosynthèse d'anthocyane est normalement régulée par le phytochrome mais les cellules de type *aureus* étant déficientes en phytochrome A, elles ne produisent pas d'anthocyane en temps normal, d'où leur couleur jaune (*aureus*). Ils ont également démontré que des antagonistes du GMPc inhibent la synthèse d'anthocyane chez les cellules de type sauvage. Ceci semble indiquer que le GMPc soit présent chez les plantes supérieures et qu'il y joue un rôle comme second messenger. On ne sait cependant toujours pas si c'est la guanylate cyclase ou la GMPc phosphodiesterase qui agit comme effecteur.

#### **1.2.4 La calmoduline et autres protéines liant le calcium**

Le calcium a été impliqué dans plusieurs phénomènes dont: la mitose, la croissance polarisée des cellules, le phototropisme, le géotropisme, le froid, les processus médiés par les régulateurs de la croissance et la stimulation mécanique (Gehring, C.A. et al. 1990; Hepler, P.K. et Wayne, R.O. 1985; Knight, M.R. et al. 1991; Knight, M.R., Smith, S. et Trewavas, A.J., 1992; Trewavas et Gilroy, 1991; voir aussi Webb, A.A.R.

et al. 1996). Comment autant de processus différents peuvent-ils être médiés par ce simple ion ? Le  $\text{Ca}^{2+}$  a la capacité d'activer directement certaines protéines kinase (dite dépendantes du calcium) ou de se lier à la calmoduline (CaM) qui peut, à son tour, activer d'autres types de protéines kinases (dépendante de la CaM). La finesse du mécanisme de contrôle dépend de l'orchestration dans l'espace et dans le temps du calcium, de la calmoduline ainsi que des différents types de kinases.

La calmoduline ainsi que d'autres protéines liant le calcium ont été trouvées chez les plantes supérieures (Ling, V. et Zielinski, R.E., 1989; Perera, I.Y. et Zielinski, R.E., 1992). Notons entre autres TCH1, un gène de CaM, ainsi que TCH2 et TCH3 des gènes apparentés à la CaM, qui ont tous été isolés chez *Arabidopsis* et dont l'ARNm est induit par une stimulation mécanique (Braam, J. et Davis, R.W., 1990 et Sistrunk, M. et al, 1994). Cependant, le rôle de chacune de ces protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des réactions aux stress mécaniques n'est pas connu, de même qu'elles ne peuvent toujours pas être liées à une voie de transduction de signaux particulière jusqu'à présent.

### 1.2.5 Les protéines kinases

Les protéines kinases sont un maillon indispensable des voies de transduction de signaux. Comme on le sait, les protéines kinases ont la capacité d'attacher de façon covalente le groupement phosphate  $\gamma$  de l'ATP à d'autres molécules. Le plus souvent, cette réaction se fait par le biais du groupement hydroxyle des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine. L'ajout d'un groupement phosphate sur la chaîne polypeptidique d'un enzyme permet de modifier sa spécificité enzymatique, sa localisation ou sa capacité de liaison. L'efficacité des protéines kinases est d'autant plus fine que la phosphorylation est rendue réversible par la présence de phosphatases spécifiques. En d'autres mots, les duos kinases/phosphatases permettent non seulement une transduction de signaux dans l'espace, mais également dans le temps. Les protéines kinases sont impliquées dans une multitude de processus nécessitant un contrôle strict: les voies métaboliques, l'expression des gènes, le cycle cellulaire,

l'architecture du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, pour n'en nommer que quelques-uns.

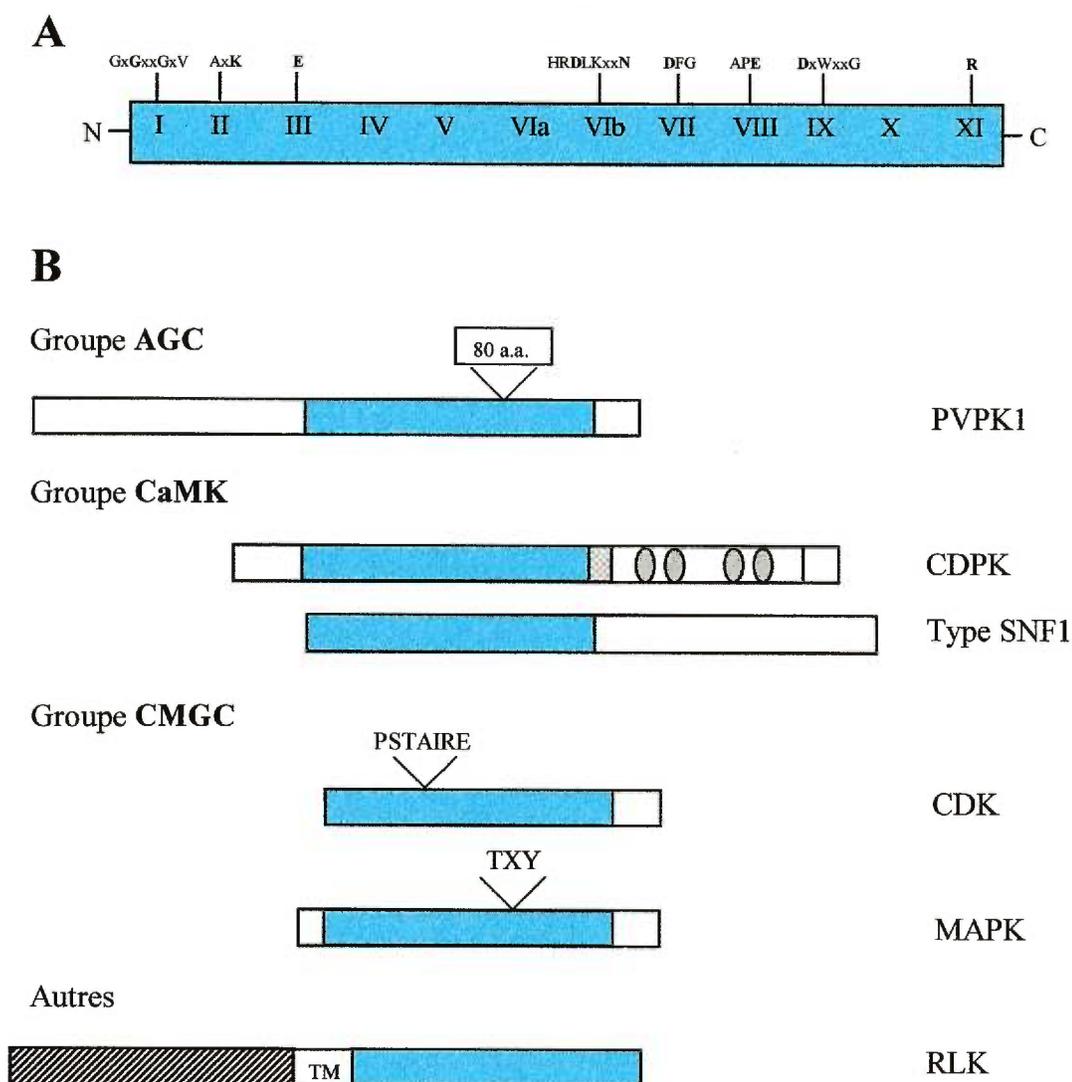
Les protéines kinases sont un outil universel que l'on retrouve chez tous les organismes eucaryotes. Le domaine catalytique des protéines kinases eucaryotes compte environ 250 à 300 acides aminés (Hanks, S.K., Quinn, A.M. et Hunter, T., 1988). Ces acides aminés sont organisés en 12 régions très conservées entrecoupées de régions de moins grande conservation. La figure 4 montre une représentation schématique du domaine catalytique des protéines kinases eucaryotes. Trois rôles distincts peuvent être assignés au domaine catalytique kinase: 1) Lier et orienter le groupement donneur de phosphate (ATP ou GTP) sous forme d'un complexe avec un cation divalent (le plus souvent  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ ); 2) Lier et orienter la protéine (ou le peptide) qui sert de substrat; 3) Transférer le groupement  $\gamma$ -phosphate de l'ATP (ou GTP) sur le groupement hydroxyle de la chaîne secondaire de l'un des acides aminés (habituellement sérine, thréonine ou tyrosine) formant la protéine servant de substrat.

Cette capacité des protéines kinase de phosphoryler divers acides aminés fait que l'action des protéines kinases a un spectre varié d'effets possibles: Les phosphotyrosines sont des groupements volumineux qui servent principalement d'ancre entre les protéines. Un motif particulier de reconnaissance des phosphotyrosines, nommé *Src-homology 2* (SH2), permet aux protéines le possédant de lier des phosphotyrosines. Pour leur part, les phosphosérines et les phosphothréonines sont des groupements de plus petites tailles et l'effet de leur présence au sein d'une protéines se fait principalement sentir par une altération de charge menant à un changement de la conformation du site de liaison au substrat de la protéine.

Une grande variété de protéine kinase ont été identifiées chez plusieurs plantes supérieures. Certaines sont homologues à des protéines kinases connues au niveau du règne animal alors que d'autres sont particulières au règne végétal. Les prochaines pages seront consacrées à la revue des principaux types de protéines kinases connues

chez les plantes supérieures. La classification utilisée est celle qui a été proposée en 1995 par Hanks et Hunter.

## Classification des protéines kinases retrouvées chez les plantes



**Figure 4:** **A.** Représentation schématique du domaine catalytique d'une protéine kinase eucaryote typique. Les douze sous-domaines conservés sont représentés par des chiffres romains. Les séquences consensus sont indiquées au-dessus de certains sous-domaines avec les résidus invariables en gras. **B.** Représentation schématique des principaux items caractérisant les trois grands groupes de protéines kinases: AGC, CaMK et CMGC. Les kinases regroupées dans la catégorie "Autres" ont des caractéristiques distinctes qui ne permettent pas de les intégrer à l'intérieur de l'un des trois groupes. **Légende:** Bleu: domaine catalytique; Ovale gris: sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ ; TM: passage transmembranaire; Quadrillés: domaine d'autoinhibition; Obliques: domaine de liaison au ligand (LRR, domaine similaire à EGF ou domaine d'homologie à SLG).

### 1.2.5.1 Le groupe "AGC"

Le groupe "AGC" comprend toutes les kinases dépendantes des nucléotides cycliques (PKA et PKG) de même que les protéines kinases dépendantes des phospholipides et du  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) (Voir D sur figure 2). Ce groupe est très peu représenté chez les plantes.

PVPK-1, une des premières protéines kinases clonée chez les plantes rapportée dans la littérature, fait partie du groupe "AGC". Depuis, plusieurs autres protéines kinases homologues à PVPK-1 ont été trouvés chez d'autres plantes. Les membres de la famille PVPK-1 démontrent une similarité de séquence pour la PKA. Ils se distinguent cependant par une insertion de 70 à 90 acides aminés localisé du côté C-terminal dans le domaine catalytique (voir figure 4B). La famille PVPK-1 est unique aux plantes et jusqu'à présent, sa fonction demeure inconnue.

Une protéine kinase ayant beaucoup de similarité fonctionnelle avec PKC, a récemment été trouvée chez la pomme de terre (Subramaniam, R. et al., 1997). La caractérisation biochimique de la fraction particulée de tubercule de pomme de terre, par ce groupe, a démontré qu'une protéine d'environ 78 kDa pouvait être immunoprécipitée à l'aide d'anticorps spécifiques contre l'isoforme humaine de la PKC. Il a également été démontré que le produit de l'immunoprécipitation produit une bande d'activité kinase de 78 kDa et qu'il phosphoryle le peptide  $\alpha$  (un substrat spécifique aux PKC). Cette protéine kinase, homologue à PKC, serait possiblement impliquée au niveau du mécanisme de défense contre les infections. Elle n'a cependant pas encore été purifiée à homogénéité ni clonée.

### 1.2.5.2 Le groupe "CaMK"

Le groupe "CaMK" comprend les protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et de la calmoduline ainsi que la famille des protéines kinases activées par l'AMP, souvent désignée sous le nom d'homologues de SNF1<sup>5</sup> (voir D sur figure 2).

La plupart des protéines kinases de plante se retrouvant dans le groupe "CaMK" sont dépendantes du calcium mais indépendantes de la calmoduline (CDPK). Deux exceptions notables à cette règle sont la protéine kinase clonée par Watillon et al. (1993) chez la pomme et une protéine kinase de *Lilium longiflorum* exprimée chez *E. coli* (Patil, S., Takezawa, D. et Poovaiah, B.W., 1995). Ces protéines peuvent lier la calmoduline et démontrent une forte homologie avec la CaMKII<sup>6</sup>.

#### Les CDPK

Les protéines kinases dépendantes du calcium que l'on retrouve chez les plantes sont appelées CDPK. Elles se distinguent des protéines kinases que l'on retrouve chez les mammifères par le fait qu'elles n'ont besoin ni de calmoduline, ni de phospholipides ou de diacylglycérol pour fonctionner. Au niveau de leur structure, on remarque la présence de quatre motifs permettant de lier le calcium (hélice-boucle-hélice ou main EF) situés du côté C-terminal du domaine catalytique (voir les ovales gris sur figure 4B). Étant donné que ce domaine peut, tout comme la calmoduline, lier quatre ions calcium, on l'appelle souvent domaine d'homologie à la calmoduline. De plus, un domaine possible d'autoinhibition est situé entre le domaine catalytique et les motifs

---

<sup>5</sup> SNF1 est une protéine ser/thr kinase que l'on retrouve chez *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est responsable de l'activation constitutive du gène répressible par le glucose, SUC2, qui code pour une invertase. SNF1 est donc nécessaire à la catabolise de certains sucres.

<sup>6</sup> La  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline-dépendante protéine kinase II (CaMKII) est l'exemple de protéine kinase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et de la calmoduline le mieux étudié. La CaMKII se retrouve au niveau toutes les cellules animales mais en plus forte concentration au niveau des cellules du système nerveux.

de liaison du calcium (Harmon, A.C., Yoo, B.-C. et McCaffery, C., 1994 et Harper, J.F., Hang, J.-F. et Lloyd, S.J., 1994).

Les CDPK ont été retrouvés chez un grand nombre de plantes, sous différentes formes: solubles, associées à la membrane, au cytosquelette ainsi qu'à la chromatine. Cette variété de localisation cellulaire suggère que cette famille de protéines kinases soit impliquée au niveau de plusieurs voies de transduction de signaux différentes.

Une CDPK spécifique au pollen a été clonée chez le maïs (Estruch, J.J. et al., 1994). Des analyses de type Western ont démontré que cette CDPK est retrouvée principalement au niveau de l'étape de germination du pollen. De plus, il a été démontré que la germination du pollen et la croissance des tubes polliniques *in vitro* sont suspendus lors de traitements avec un antagoniste de la calmoduline (calmidazolium), un inhibiteur des CDPKs (W-7) ainsi qu'avec des oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm correspondant à cette CDPK. Ces résultats indiquent donc que la fonction de cette CDPK est nécessaire à la germination du pollen et à la croissance des tubes polliniques. Le mécanisme exact n'est pas connu, cependant un modèle a été proposé: Les variations au niveau de la concentration de  $Ca^{2+}$  moduleraient l'activité catalytique de la CDPK, menant à la phosphorylation d'un substrat (encore non identifié) qui serait impliqué au niveau de la réorganisation du cytosquelette, nécessaire à la croissance des tubes polliniques. L'implication des CDPKs au niveau des interactions entre l'actine et la myosine chez les plantes a déjà été démontrée par des études biochimiques et immunocytologiques (Roberts, D.M. et Harmon, A.C., 1992) (voir aussi section 1.1.3 au sujet de la relation qui existe entre la croissance des tubes polliniques et le  $Ca^{2+}$ ).

### **Les protéines homologues à SNF1**

Des protéines homologues à SNF1 ont été identifiées chez plusieurs espèces de plantes. Notons entre autres RKIN1 que l'on a trouvé chez l'orge et NPK5 du tabac. Ces deux protéines kinases peuvent restaurer la mutation SNF1<sup>-</sup> qui rend la levure incapable d'utiliser certains sucres comme source de carbone (Alderson, A. et al., 1991

et Muranaka, T., Banno, H. et Machida, Y., 1994). Il est donc proposé que certaines protéines homologues à SNF1 retrouvées chez les plantes pourraient avoir un rôle au niveau de la catabolise des sucres et, par le fait même, du métabolisme du carbone. D'autre part, l'expression de certaines protéines homologues à SNF1 semble être régulée au niveau transcriptionnel par des changements environnementaux. Par exemple, le niveau de transcription de PKABA1 augmente en réponse à une privation d'eau (Anderberg, R.J. et Walker-Simmons, M.K., 1992). De même, la quantité d'ARNm de *wpk4* du blé augmente face à une privation de nutriments ou une exposition à la lumière (Sano, H. et Youssefian, S., 1994). Globalement le rôle des protéines de type SNF1 pourrait en être un d'adaptation des voies métaboliques en réponse aux changements environnementaux (Hardie, D.G., 1994).

### 1.2.5.3 Le groupe "CMGC"

L'appellation "CMGC" regroupe les protéines homologues aux protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK), aux protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), à la protéine kinase 3 de la glycogène synthase (GSK-3), retrouvé chez l'humain, ainsi qu'aux protéines caséine-kinases II (CKII) retrouvées chez la levure et chez l'humain. Des homologues pour chacune de ces catégories de protéines ont été trouvés chez les plantes supérieures. Les protéines du groupe "CMGC" sont caractérisées, au niveau de leur structure, par la présence d'un site de régulation par la phosphorylation, situé dans leur domaine catalytique, entre les sous-domaines VII et VIII. Ce site de régulation est appelé boucle d'activation.

#### Les homologues des CDK

Les protéines kinases de la famille de CDK sont impliquées au niveau du contrôle de la progression du cycle cellulaire. Elles fonctionnent en duo avec les cyclines: la cycline représente la sous-unité régulatrice alors que la CDK est la sous-unité catalytique. Des protéines de la famille CDK ainsi que des homologues de la cycline

ont été isolées chez plusieurs plantes, dont la luzerne et *Arabidopsis* (Hirt, H. et al., 1991 et Bender, J. et Fink, G.R., 1994).

En plus de sa régulation par la cycline, la CDK est également régulée par la phosphorylation. Tout comme pour la majorité des kinases, la phosphorylation d'un résidu thréonine active la CDK. Cependant, il a été observé que la phosphorylation de résidus tyrosine sur la CDK n'a pas le même effet d'une espèce à l'autre. Alors que chez l'humain de même que chez *Schizosaccharomyces pombe*, la phosphorylation d'un résidu tyrosine désactive la CDK, ceci n'est pas observé chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'activation par phosphorylation des homologues de CDK retrouvés chez les plantes n'a pas encore été suffisamment étudiée pour pouvoir en tirer des conclusions. Cependant, comme les sites de régulation par la phosphorylation sont conservés et qu'on les retrouve sur les homologues de CDK chez les plantes, tout porte à croire que la régulation par phosphorylation a également lieu au niveau des homologues de CDK chez les plantes (Stone, J.M. et Walker, J.C., 1995).

Au niveau de leur structure, les protéines kinases de la famille CDK retrouvées chez les plantes sont caractérisées par le motif conservé "PSTAIRE<sup>7</sup>" situé dans leur domaine catalytique. Des expériences de complémentation ont été tentées sur des mutants de levure à l'aide d'homologues de CDK provenant de plantes. Les résultats obtenus démontrent que la complémentation n'est pas possible dans tous les cas (pour une revue voir Doerner, P.W., 1994).

### **Les MAP Kinases**

Les protéines kinases activées par les mitogènes (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK) sont aussi appelées ERK pour "*Extracellular signal-Regulated kinases*" (Protéines kinases répondant aux signaux extracellulaires). Ce sont des protéines

---

<sup>7</sup> Les lettres P-S-T-A-I-R-E font appel aux symboles à une lettre représentant les acides aminés. Elles signifient donc: proline-sérine-thréonine-alanine-isoleucine-arginine-acide glutamique.

sérine/thréonine kinases qui, comme leur nom l'indique, font le lien, sous forme de cascade de phosphorylation, entre des signaux provenant du milieu extracellulaire et des cibles intracellulaires. Leur activation nécessite la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine d'un motif conservé (TXY) situé dans leur domaine catalytique (Anderson, N.G. et al., 1990). Cette activation se fait par le biais d'un type particulier de protéines kinases: les MAPK kinases (MAP2K). Les MAP2K sont uniques car elles peuvent phosphoryler des résidus sérine, thréonine, et aussi tyrosine (Posada, J. et al., 1991). L'activation des MAP2K se fait également par le biais de la phosphorylation, sur des résidus thréonine cette fois. Ce sont des MAP3K qui activent les activateurs des MAPK (Hattori, S. et al., 1992; Kyriakis, J.M. et al., 1992; Lange-Carter, C.A. et al., 1993). Des clones ayant de l'homologie pour les MAP2K (Shibata, W. et al., 1995) ainsi que pour les MAP kinase kinase kinase (Kieber, et al., 1993; Banno, H. et al., 1993; Mizoguchi, T. et al., 1996) ont été identifiés chez le tabac et chez *Arabidopsis*, ce qui semble indiquer que la cascade de phosphorylation serait conservée chez les plantes (Pour des revues, voir Jonak, C., Heberle-Bors, E. et Hirt, H., 1994 et Hirt, H., 1997).

Un nombre impressionnant de protéines de type MAPK ont été clonées chez les plantes dans les dernières années (Duerr, et al., 1993; Stafstrom, et al., 1993; Mizoguchi et al. 1993; Jonak et al. 1995; Wilson et al. 1995 pour n'en citer que quelques-uns). Cependant, on en connaît relativement peu concernant la fonction de ces protéines. Il a été démontré que, chez les plantes, des MAPK sont régulées par divers stimuli: le toucher et les blessures (Bögre, L. et al., 1996, 1997; Usami, S. et al., 1995; Seo, S. et al., 1995), le froid et la sécheresse (Jonak, C. et al., 1996; Mizoguchi, T. et al., 1996), l'éliciteur produit par un pathogène (Ligterink, W. et al., 1997) ainsi que par des hormones végétales tel l'acide salicylique (Zhang, C. et Klessig, D.F., 1997), l'acide abscisique (Knetsch, M.L.W. et al., 1996), l'acide gibberellique (Huttley, A. et Phillips, A.L., 1995), ainsi que l'auxine (Mizoguchi, T. et al., 1994).

Dernièrement, une MAPK activée en réponse à l'hydratation du pollen a également été identifiée chez le tabac (Wilson, C. et al., 1997). Cette MAPK possède plus de 90 % d'identité avec une MAPK identifiée chez le pois (PsMAPK) qui peut compléter partiellement les mutants de délétion *hog1* de *S. cerevisiae* (Pöpping, B., Gibbons, T. et Watson, M.D., 1996). La voie de signalisation des MAPK HOG1 est impliquée au niveau de l'osmorégulation chez *S. cerevisiae* (Brewster, J.L. et al., 1993). La voie MAPK identifiée chez le tabac pourrait donc également jouer un rôle au niveau de l'osmorégulation, d'autant plus qu'elle est activé par l'hydratation du pollen.

Chez *Petunia hybrida*, un clone (PMEK, pour *Petunia MAP/ERK related Kinase*) ayant de l'homologie avec la famille des MAPKs a été isolé d'une banque d'ADNc spécifique aux ovules (Decroocq-Ferrant, V. et al., 1995). Il a été démontré que l'ARNm correspondant est accumulé, de façon préférentielle, au niveau des organes reproducteurs femelles. Le motif TXY requis pour l'activation par la phosphorylation chez les MAPKs se retrouve sur la protéine PMEK1. La comparaison de la séquence d'acides aminés de PMEK1 avec celle d'autres protéines MAPK retrouvées chez les plantes a permis de démontrer que PMEK1 fait partie du même sous-groupe de MAPK que NTF3 retrouvée chez le tabac (96 % identique) et ATMPK1 d'*Arabidopsis* (83 % identique). La possibilité de l'implication de PMEK1 au niveau du développement de l'ovule a été soulevée mais jusqu'à présent la fonction exacte de PMEK1 reste inconnue.

### **Les homologues de la CKII**

Les membres de la famille de la caséine kinase II (CKII) que l'on retrouve chez les levures et les mammifères sont des enzymes multifonctionnelles tétramériques. Le tétramère est composé de deux sous-unités  $\alpha$  catalytiques et de deux sous-unités  $\beta$  régulatrices. La CKII est impliquée au niveau de la régulation de la division cellulaire, de la réplication de l'ADN et de l'expression des gènes.

Chez les plantes, des homologues des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la CKII ont été retrouvés sous formes monomérique et oligomérique (Dobrowolska, G. et al., 1991; Collinge, M.A. et Walker, J.C., 1994; Mizoguchi, T. et al., 1993). Des expériences, faites avec des recombinants des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , ont démontré que chez *Arabidopsis* le complexe tétramérique  $\alpha_2\beta_2$  peut se former et que chaque sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  joue leur rôle respectif (Klimczak, L.J. et al., 1995).

### Les homologues de GSK-3

Chez les mammifères, la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) est impliquée au niveau des réponses hormonales. Chez la drosophile, il existe un homologue bien connu de la GSK-3, nommé *shaggy/zeste-white-3* (*sgg/zw3*), qui est impliqué au niveau du destin cellulaire et de la polarité durant l'embryogenèse.

Chez les plantes, les homologues de GSK-3 sont codés par des petites familles à gènes multiples. Trois homologues de la GSK-3 trouvés chez la luzerne, nommés MSK1-2 et 3, sont exprimés de façon différentielle au cours du développement (Pay, A. et al., 1993). De même chez *Arabidopsis*, au moins 5 homologues (Les ASK) ont été trouvés (Bianchi, M.W. et al., 1994). Le fait d'avoir trouvé plusieurs homologues de la GSK-3 ayant des patrons d'expression différents semble indiquer que les homologues de la GSK-3 trouvés chez les plantes pourraient être impliqués au niveau du développement.

Également en faveur de cette hypothèse est la découverte de clones d'ADNc provenant d'une librairie spécifique aux ovules de *Petunia hybrida*. Plusieurs clones ont été obtenus par une approche de clonage par homologie de séquence pour les sous-domaines VI et VIII du domaine catalytique de GSK-3 (Ferrant, V. Van Went, J., Kreis, M., 1994 et Decroocq-Ferrant, V., 1995b. Cinq clones nommés PSK (pour *Petunia Shaggy related Kinase*) ont été caractérisés. L'un d'entre-eux, PSK-6, démontre environ 70% d'identité pour le domaine catalytique de GSK-3 retrouvée

chez le rat. Un tel niveau de conservation entre des séquences provenant d'un mammifère et d'une plante pourrait indiquer que la fonction est conservée.

### 1.2.5.4 Le groupe RLK

Le groupe des "Autres" tel que nommé par Hanks et Hunter est en fait l'un des groupes les mieux représentés chez les plantes. Ce groupe comprend toutes les protéines kinases qui n'ont pu être adéquatement associées à l'un des trois groupes décrits précédemment. Chez les plantes, ce groupe est composé de protéines kinases uniques au règne végétal de même que de protéines kinases ayant des homologues chez d'autres types d'organismes. Étant donné l'ampleur que prend ce groupe chez les plantes, il a été renommé groupe RLK.

#### Les RLK

Les RLK (*Receptor-Like Kinase*, que l'on pourrait traduire par "protéines kinases de type récepteur") forment une famille, sans cesse grandissante, qui est unique au règne végétal. Les RLK sont, pour la plupart, des protéines transmembranaires qui partagent de l'homologie, au niveau de leur structure, avec les RTK (*Récepteur Tyrosine Kinase*). Leur domaine catalytique est hautement conservé alors que leur domaine extracellulaire présente beaucoup de variations. Les RLKs ont donc été divisés en trois classes (voir Walker, J.C., 1994) selon leur type de domaine extracellulaire: ceux qui ont un domaine homologue à la glycoprotéine SLG du locus S d'autoincompatibilité des Brassicaceae, ceux qui possèdent un domaine extracellulaire de répétition riche en leucine (LRR pour *Leucine-Rich Repeat*) et enfin, une troisième catégorie ne comportant qu'un seul membre, Pro25, retrouvé chez *Arabidopsis* (Kohorn, B.D., Lane, S. et Smith, T.A., 1992). Pro25 possède, dans son domaine extracellulaire, deux répétitions d'un motif homologue au facteur de croissance épidermique (EGF pour *Epidermal Growth Factor*). Il a été proposé que les différents types de domaines extracellulaires permettraient d'utiliser un même mécanisme de base (les RLK) pour répondre à différents signaux extracellulaires (pour une revue voir Braun, D.M. et Walker, J.C., 1996)<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> Le sujet des RLK a déjà été abordé à la section 1.2.1 du présent ouvrage.

La classe SRK a été nommée d'après les récepteurs kinase retrouvés chez *Brassica oleraceae*, SRK-2 et 6 (Stein, J.C. et al., 1991). Un rôle au niveau de la reconnaissance du pollen est proposé pour SRK-2 et 6, d'abord à cause de l'implication de la glycoprotéine SLG au niveau de l'autoincompatibilité et également à cause de la localisation des SRK au niveau des organes reproducteurs.

Des membres de la classe SRK ont été retrouvés chez plusieurs autres espèces de plantes dont: le maïs, ZmPK1 (Walker, J.C. et Zhang, R., 1990), *Brassica napus*, SRK-910 (Goring, D.R. et Rothstein, S.J., 1992), *Arabidopsis*, ARK-1 (Tobias, C.M. et al., 1992), ARK-2 et 3 (Dwyer, K.G., 1994), RLK-1 et 4 (Walker, J.C., 1993) et le riz, OsPK10 (Zhao, Y. et al., 1994). Comme plusieurs de ces derniers ont été retrouvés de façon prédominante au niveau des organes végétatifs, il est clair que les membres de la classe SRK ont des fonctions variés et que le domaine d'homologie à SLG ne sert pas seulement au niveau de la reconnaissance du pollen.

Nous nous attarderons plus en détails sur la classe LRR dont au moins deux membres présentent un intérêt particulier dans le contexte actuel, tout d'abord parce qu'ils ont été retrouvés chez des membres de la famille des *Solanaceae* et également parce qu'ils sont exprimés spécifiquement au niveau des tissus reproducteurs.

Les membres de la classe LRR ont été retrouvés chez *Arabidopsis*: TMK-1 (Chang, C. et al., 1992), TMKL-1 (Valon, C. et al., 1993), RLK-5 (Walker, J.C., 1993), ERECTA (Torii, K.U. et al., 1996) et CLAVATA-1 (Clark, S.E. et al., 1996); chez le pétunia: PRK-1 (Mu, J.-H., Lee, H.-S. et Kao, T.-H., 1994); chez le riz: Xa21 (Song, W.Y. et al., 1995); ainsi que chez la tomate: LePRK-1 et 2 (Muschiatti, J., Eyal, Y. et McCormick, S., 1998).

Le motif LRR est présent chez des protéines provenant de différentes espèces, ayant une gamme de fonctions et de localisations cellulaires variée. La caractéristique commune aux protéines possédant un motif LRR est leur capacité à interagir avec

d'autres protéines. Jusqu'à présent, aucune interaction du domaine LRR avec une autre protéine n'a été directement démontrée chez les plantes.

Le clone PRK-1, retrouvé au niveau du pollen chez *Petunia inflata*, est hors du commun. Bien que l'analyse de la séquence de PRK-1 ait prédit une activité sérine/thréonine kinase, il s'est avéré que la portion cytoplasmique de PRK-1 peut s'autophosphoryler sur des résidus sérine et tyrosine, ce qui suggère que PRK-1 soit une kinase à spécificité double (*Dual specificity kinase*) telle que ADK-1 retrouvée chez *Arabidopsis* (Ali, N., Halfter, U. et Chua, N.-H., 1994). Afin d'en apprendre davantage sur la fonction d'un tel type de kinase au niveau du pollen, des expériences de mutation par surexpression antisens ont été réalisées chez *Petunia inflata* (Lee, H.-S. et al., 1996). Ces travaux ont démontré que PRK-1 est nécessaire au développement post-méiotique du pollen. D'autre part, il a été récemment démontré que l'ARNm correspondant au clone PRK-1 est présent, non seulement au niveau du pollen, mais également dans les ovaires, bien qu'à un niveau nettement moindre (Lee, H.-S. et al., 1997). Il semble que PRK-1 joue un rôle significatif au niveau des ovaires puisqu'en présence de l'antisens PRK-1, le développement du sac embryonnaire, d'environ 50 % des ovules, est arrêté au niveau des derniers stades de mégagamétogénèse (Lee, H.-S. et al., 1997). Il est à noter que les auteurs ont détecté la présence d'un homologue de PRK-1 chez *Solanum chacoense*.

Les deux clones retrouvés chez la tomate, LePRK-1 et 2 sont spécifiquement exprimés au niveau du pollen. Il a été démontré que les protéines LePRK-1 et 2 ont une activité kinase lorsqu'elles sont exprimées chez *E. coli* et qu'elles sont toutes deux situées sur la membrane plasmique au niveau des tubes polliniques. Lors d'essais de phosphorylation sur des préparations de membranes de tubes polliniques, il a été démontré que la protéine LePRK-2 est phosphorylée (Muschietti, J., Eyal, Y. et McCormick, S., 1998). Les auteurs proposent, pour LePRK-2, un rôle au niveau de l'interaction compatible entre le pollen et le pistil. Il est suggéré que le signal provenant du style en serait un d'inactivation de la voie de signalisation puisqu'il a été

démontré que l'interaction avec des extraits de style de tomate provoque la déphosphorylation de LePRK-2.

D'autre part, certaines protéines homologues aux RLK se distinguent par le fait qu'elles ne possèdent pas de domaine extracellulaire. NPK15, un clone d'ADNc retrouvée chez le tabac en est un bon exemple. La séquence de NPK15 prédit une protéine sérine/thréonine kinase, homologue aux RLK, mais possédant un simple domaine hydrophobe du côté N-terminal plutôt qu'un passage transmembranaire comme en possède les autres membres de la famille RLK. Une hypothèse a été lancée comme quoi ce domaine hydrophobe pourrait servir d'ancrage à la membrane pour cette protéine. Pto<sup>9</sup> et Fen<sup>10</sup>, des clones retrouvés chez des mutants de la tomate, ont également de l'homologie pour les RLK, bien qu'ils ne possèdent pas de domaine extracellulaire (Martin, G.B. et al., 1993 et 1994). Leur séquence prédit toutefois un site de myristoylation situé en N-terminal, ce qui pourrait signifier que Pto et Fen seraient également associés à la membrane.

Un groupe de chercheur a récemment isolé, chez le tabac, ce qui pourrait être un membre, particulièrement digne de mention, de la famille RLK. L'analyse de la séquence de NTS16 indique qu'il s'agirait d'une sérine/thréonine kinase qui démontre de l'homologie, au niveau du domaine catalytique, pour certains membres de la famille RLK, cependant, comme dans le cas de NPK15, NTS16 ne possède pas de domaine extracellulaire mais un domaine hydrophobe en N-terminal, qui pourrait servir d'ancrage à la membrane. NTS16 a été sélectionné lors d'une recherche par la technique de *differential display PCR* pour des ARNm présentant une accumulation suite à la pollinisation. Ce qui rend NTS16 si intéressant c'est que l'ARNm correspondant est exprimé de façon préférentielle au niveau du pistil ce qui indique

---

<sup>9</sup> Gène de résistance au pathogène *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pto) retrouvé à l'origine chez la tomate sauvage *Lycopersicon pimpinellifolium*.

<sup>10</sup> Gène de sensibilité à un insecticide, le fenthion, également retrouvé à l'origine chez la tomate sauvage *Lycopersicon pimpinellifolium*.

qu'il pourrait jouer un rôle au niveau de la réponse à la pollinisation (Li, H.-Y. et Gray, J.E., 1997).

La possible localisation membranaire de ces protéines homologues aux RLK semble indiquer qu'elles pourraient faire partie d'un complexe de protéines qui, en association à un récepteur membranaire, serait nécessaire aux premières étapes de la transduction de signaux vers le cytoplasme.

### **1.3 Projet de recherche**

Le but visé par ce projet de recherche est d'étudier les voies de transduction de signaux impliquées au cours des événements hâtifs de reproduction chez les plantes. Nous avons choisi de porter une attention particulière aux événements de phosphorylation survenant au niveau du pistil, dans les quatre jours suivant une pollinisation compatible. Cette période de temps inclut la fécondation ainsi que les premières étapes de formation du fruit et des graines.

Le projet comprend 3 étapes principales, mettant chacune à profit une approche différente. Premièrement, montrer que des changements au niveau du profil d'expression des protéines sont observables suivant la pollinisation et mettre au point une méthode de séparation efficace des protéines en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle. Deuxièmement, démontrer la présence d'activité kinase spécifique aux événements découlant de la fécondation par une analyse des profils d'activité sur gel en utilisant différents substrats des protéines kinases. De façon parallèle, isoler des protéines démontrant une activité kinase induite suivant les événements de fécondation par criblage fonctionnel d'une banque d'ADNc.

## 2.0 Matériel et méthodes

---

### 2.1 Matériel

#### Matériel végétal

Le système modèle utilisé est *Solanum chacoense*, une espèce de pomme de terre sauvage apparentée à *Solanum tuberosum*, la pomme de terre cultivée. C'est une plante auto-incompatible, c'est-à-dire qu'elle possède un système de reconnaissance spécifique du pollen permettant le rejet (l'arrêt de croissance) des tubes polliniques provenant de la même plante ou de plantes de constitution génétique semblable. Cette particularité nous permet de maîtriser le moment exact de la pollinisation sans avoir recours à l'émasculatation.

La culture des plants se fait dans les serres de l'Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV) sur le site du Jardin botanique de Montréal. La température dans les serres est maintenue à environ 22°C à 26°C le jour et 18°C à 20°C la nuit. Les plants disposent de 13 heures d'éclairage l'hiver et de 14 heures d'éclairage l'été. Un fertilisant de type 20-20-20 leur est fourni sur une base bimensuelle. De nouveaux plants sont générés périodiquement par culture in vitro dans les laboratoires de l'Institut de recherche en biologie végétale. Tous les croisements ont été effectués entre deux génotypes complètement compatibles au niveau des allèles S d'incompatibilité, soit 582 (S13, S14) X L25 (S11, S12) ou 582 (S13, S14) X 314 (S11, S12) (Birhman, R.K. *et al.* 1994).

#### Matériel scientifique et réactifs

Les appareils d'électrophorèse uni et bi-dimensionnelle (*Mini Protean II*), les marqueurs de poids moléculaire (*low range SDS PAGE et kaléidoscope prestained standards*), la solution de Bradford ainsi que les Bio-lyte 3/10 et 5/7 proviennent de

chez Bio-Rad (Hercules, CA). La [<sup>35</sup>S] L-méthionine (10μCi/μL) et le [<sup>32</sup>P] γ ATP (10μCi/μL) sont achetés chez *ICN Biomedical*. Le système de traduction in vitro utilisé (*wheat germ extract translation kit*) provient de Roche diagnostique (Laval, QC). L'oligo(dT)-cellulose utilisée lors de la purification des ARNm provient de chez Pharmacia (Baie d'Urfé, QC). Les membranes de nitrocellulose sont la Hybond-C Pure de *Amersham Life Science* ou la Protran (BA-85) de *Schleider and Schuell*. Le comptage des échantillons radioactifs s'est fait avec le compteur à scintillation 1214 Rackbeta de LKB Wallac. Le spectrophotomètre utilisé est le Beckman DU-65.

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Protocole d'extraction des ARN

Les tissus sont broyés dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre homogène. La poudre est ensuite transférée du mortier vers un tube stérile de 50 ml refroidi quelques secondes dans l'azote. On ajoute ensuite, pour chaque 2 g de tissus, 4,5 ml de tampon d'extraction (0,1M NaCl, 0,01M Tris pH 7,5, 1mM EDTA, 1 % (p/v) SDS) froid ainsi qu'un volume égal de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1). Le mélange est agité vigoureusement durant 10 à 15 min L'homogénat est ensuite transféré dans des tubes à centrifugation en polypropylène (Sarstead, 13 ml) ou dans des tubes corex et centrifugé durant 15 min à 9500 rpm (9686g, rotor F0850) dans une centrifugeuse Beckman GS-15R à 4°C. Suite à la centrifugation, la phase aqueuse qui contient les acides nucléiques est transférée dans un nouveau tube à centrifugation en prenant soin de ne pas recueillir l'interface blanchâtre qui contient des protéines, des lipides ainsi que des débris de parois cellulaires. On procède ensuite à deux extractions des protéines en ajoutant à la phase aqueuse 1 volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) froid et en agitant vigoureusement pendant 5 à 10 min. Après chaque extraction, une centrifugation de 15 min à 9500 rpm est effectuée afin de séparer les phases aqueuses et organiques. Après la

deuxième extraction au phénol:chloroforme, la phase aqueuse est recueillie dans un nouveau tube à centrifugation et 1 vol. de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) y est ajouté afin d'extraire les résidus de phénol se trouvant dans la phase aqueuse. On agite vigoureusement pendant 5 min et on procède à la centrifugation.

Après avoir recueilli la phase aqueuse, les acides nucléiques sont précipités à l'éthanol en ajoutant 1/10 vol. de 3M acétate de sodium pH 5,2 et 2,5 vol. d'éthanol 95 % froid. Les tubes sont ensuite inversés doucement plusieurs fois et placés à -20°C pour la nuit.

Le lendemain, les acides nucléiques sont culottés par une centrifugation de 30 min. à 9500 rpm et à 4°C. Le culot est rincé à l'éthanol 70 % et séché partiellement à l'air puis est resuspendu dans 1 ml d'eau traitée au DEPC et distribué dans des tubes eppendorf. On procède ensuite à la précipitation sélective des acides ribonucléiques (e. g. ARN totaux) en ajoutant 1 vol. de 4 M chlorure de lithium (LiCl) froid et en laissant reposer pour une période minimale de 3 heures, à 4°C. On centrifuge ensuite 30 min. à 14 000 g dans une centrifugeuse eppendorf modèle 5415C à 4°C. Le culot, enrichi en ARN<sub>tot</sub>, est séché partiellement à l'air puis resuspendu dans 500 µL d'eau DEPC. On procède à une autre précipitation à l'éthanol des ARN<sub>tot</sub> pour se débarrasser du LiCl. Le culot obtenu est resuspendu dans de l'eau stérile ayant au préalable été traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC, un inhibiteur de RNase). Le volume d'eau stérile utilisée pour resuspendre le culot dépend de la masse de tissus utilisée au départ. Tous les échantillons d'ARN<sub>tot</sub> sont conservés à -20°C.

### **2.2.2 Dosage des ARN totaux**

La concentration en ARN<sub>tot</sub> des différents échantillons a été évaluée de façon spectrophotométrique en mesurant l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Beckman DU-65. À cette longueur d'onde, 1 unité d'absorbance équivaut à 40 µg d'ARN par ml de solution. La quantité de protéines que contient

chacun des échantillons à été évaluée par la mesure de l'absorbance à 280 nm; ceci dans le but d'évaluer la pureté des ARNtot recueillis.

### **2.2.3 Purification d'ARNm**

La purification des ARNm se fait à l'aide de colonnes centrifugeables contenant de l'oligo(dT)-cellulose. Une quantité minimale de 1,5 mg d'ARNtot de chaque échantillon est nécessaire avant de passer à l'étape de purification des ARNm.

Le protocole de purification des ARNm utilisé est le "mRNA Separator Kit" de Clontech Laboratories (Palo Alto, CA) inspiré des méthodes décrites par Aviv, H. et Leder, P. et Sambrook, J. et *al.* (Aviv, H. et Leder, P. 1972; Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T., 1989). Les colonnes d'oligo(dT)-cellulose ainsi que les solutions ont été préparées dans notre laboratoire. La qualité des ARNm obtenus à été vérifiée visuellement par électrophorèse sur gel d'agarose et révélation au bromure d'éthidium.

### **2.2.4 Dosage des ARNm**

La concentration d'ARNm obtenue est évaluée de façon spectrophotométrique en mesurant l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Beckman DU-65. Les valeurs obtenues sont confirmées visuellement en comparant sur gel d'agarose le chargement d'une même quantité d'ARNm de chaque échantillon.

### **2.2.5 Construction de la banque d'ADNc**

Une banque d'ADNc, spécifique pour des ovaires pollinisés depuis 96 heures, a été construite avec le système ZAP Express de la compagnie Stratagene (La Jolla, CA). La synthèse du premier brin d'ADNc s'est faite à partir de 5 µg d'ARNm poly A<sup>+</sup>. L'encapsulation à été réalisée avec le système Gigapack III Gold de ZAP Express. La banque primaire a été titrée puis immédiatement amplifiée afin d'en augmenter la

stabilité. Une partie de la banque amplifiée a été conservée à 4°C pour une utilisation courante. Le reste de la banque a été aliquoté dans des tubes eppendorf et du diméthylesulfoxyde (DMSO) a été ajouté jusqu'à une concentration finale de 7%. Les aliquots ont été rangés à -80°C. Voir le protocole du fabricant pour le détail des manipulations effectuées.

## 2.2.6 Criblage de la banque d'expression

La technique de crible fonctionnel est une adaptation du protocole de criblage d'une banque d'expression avec un anticorps (chez les plantes: Ali, N., Halfter, U. et Chua, N.-H., 1994; chez les mammifères: Kornbluth, S., Paulson, K.E. et Hanafusa, H., 1988; Howel, B. et al., 1991; Letwin, K. et al., 1992; et chez la levure: Stern, D.F. et al., 1991), pour laquelle l'anticorps est remplacé par un essai kinase inspiré de la technique d'essai kinase sur membrane décrite par Ferrel et Martin (Ferrel, J.E. et Martin G.S. 1989).

Sur chaque grand pétris, 20 000 pfu provenant de la banque d'ADNc sont étalées, tel que décrit dans le protocole du fabricant (ZAP Express, Statagene). Les pétris sont mis à pré-incuber à 42°C pour 3 heures. La température de l'incubateur est ensuite réduite à 37°C et l'incubation se poursuit jusqu'à ce que les premières plages de lyses soient visibles (environ 2 heures suivant la pré-incubation). À ce moment, une membrane de nitrocellulose imbibée d'IPTG est déposée sur chaque pétri. Les pétris sont rapidement rapportés à 37°C, et l'incubation se poursuit pendant 16 heures. Le lendemain matin les pétris sont placés à 4°C pour 3 heures. Après avoir marqué la position des membranes sur les pétris, on soulève délicatement chaque membrane que l'on baigne dans une solution de TNT (10mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 0,05 % Tween 20™) afin d'éliminer les résidus de top agar.

## 2.2.7 Essai kinase sur membrane de nitrocellulose

### Dénaturation

Les membranes sont baignées 2 fois 10 min. dans 25 ml d'une solution de dénaturation (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 6 M guanidine hydrochloride) avec agitation constante.

### Renaturation

Les protéines accrochées à la membrane sont lentement renaturées par 4 bains agitant de 10 min à 4°C dans une solution de renaturation (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,04 % (v/v) Tween 20™), puis dans un bain de 100 mL pour la nuit.

### Blocage

Les sites non-occupés par des protéines sur la membrane, sont bloqués par un bain agitant d'une heure dans 50 ml de PBST (0,8 % (p/v) NaCl, 0,144 % (p/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4, 0,02 % (p/v) KCl, 0,024 % (p/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04 % Tween 20™) contenant 2 % (p/v) lait et 1X Denhardt (0,02 % (p/v) ficoll (type 400), 0,02 % (p/v) polyvinylpyrrolidone, 0,02% (p/v) BSA fraction V). Le surplus de la solution de blocage est enlevé par 2 bains de 10 min dans le PBST seul.

### Pré-incubations

Les membranes sont pré-incubées pour 15 min dans 25 ml de 30 mM tampon Hepes-HCl pH 7,5. Une deuxième pré-incubation est effectuée par un bain d'une heure dans 15mL de tampon kinase (30 mM Hepes-HCl pH 7,5, 2 mM DTT, 10 mM Chlorure de magnésium, 10 mM Chlorure de manganèse).

### Essai kinase

L'essai kinase est amorcé en ajoutant 25  $\mu$ Ci de  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP par membrane, au tampon kinase et en poursuivant l'incubation à température de la pièce, avec agitation, pour 1 heure.

### **Lavages**

La réaction de phosphorylation est arrêtée par plusieurs bains dans une solution de SSC 0,1X (0,0875 % (p/v) NaCl, 0,044 % (p/v) Citrate de sodium, pH ajusté à 7,0). Les lavages se poursuivent jusqu'à ce que la quantité de radioactivité recueillie dans la solution de lavage (mesurée à l'aide d'un compteur Geiger) soit nettement diminuée. De façon générale, 4 ou 5 lavages d'une demi-heure chacun plus un lavage extensif pour la nuit est nécessaire pour réduire le bruit de fond de façon acceptable.

### **Autoradiographie**

Suivant les lavages, les membranes sont séchées à l'air puis exposé contre un film Kodak Biomax pour 1 à 2 heures à température de la pièce.

## **2.2.8 Extraction de protéines (fraction particulaire)**

Les carpelles ou les ovaires de fleurs de *Solanum chacoense*, non-pollinisés ou pollinisés depuis 24, 36, 48, 72 ou 96 heures ont été entreposés à -80°C depuis leur dissection. Les tissus sont plongés dans l'azote liquide dès leur sortie du congélateur puis broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est transférée dans un tube à centrifugation froid, contenant 10 ml de tampon d'extraction A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM sorbitol, 100  $\mu$ M PMSF, 30 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin) froid, pour chaque 2 g de tissus pesé après qu'il ait été gelé. Les tissus sont agités doucement, sur glace, dans le tampon d'extraction, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Cette solution est ensuite centrifugée à 5000 g pour 10 min dans une centrifugeuse Beckman GS-15R (rotor angulaire F0850) à 4°C. Le surnageant est recueilli dans des tubes de polycarbonate à ultracentrifugation de Beckman puis centrifugés trois fois à 100 000 g pour 1 heure à 4°C dans une ultracentrifugeuse Beckman L7 (rotor angulaire 70,1TI). Cette centrifugation a pour but de culotter les membranes. Entre les deux premières centrifugations, le culot est délicatement resuspendu dans 8 ml de tampon d'extraction A. Les surnageants obtenus après chacune des trois centrifugations sont rassemblés. Ils constituent la fraction des

protéines solubles. Un aliquot de 10  $\mu\text{L}$ , devant servir à évaluer la concentration en protéine de l'échantillon, est prélevé. et l'échantillon ainsi que l'aliquot sont congelés rapidement à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Après la troisième centrifugation, le culot est resuspendu dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction B (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Triton X100, 30 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 100  $\mu\text{M}$  PMSF, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin) puis agité doucement à  $4^{\circ}\text{C}$  pour 1 heure. La solution est ensuite centrifugée pour 1 heure à 100 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$ . À la fin de cette étape, le surnageant est recueilli et un aliquot de 5  $\mu\text{L}$  est mis de côté en vue de mesurer la concentration en protéine de l'échantillon. L'échantillon et l'aliquot sont rapidement congelés dans l'azote liquide, avant d'être entreposés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une utilisation future.

## **2.2.9 Dosage des protéines**

L'évaluation de la concentration en protéines des échantillons, s'est fait selon la méthode décrite par Bradford (Bradford, M. 1976). Le dosage est effectué le jour même de l'extraction ou sur un aliquot ayant été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'albumine de sérum de bovin (BSA) fraction V est utilisée comme standard.

## **2.2.10 Essai kinase en gel**

### **Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes**

L'appareil mini-protean II de Bio-Rad est utilisé pour l'électrophorèse. Les gels de résolution (0,75 mm d'épaisseur, 3,2 ml de monomères) de 12,5 % polyacrylamide (12,175 % acrylamide, 0,325 % bis-acrylamide, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,06 % TEMED, 0,03 % persulfate d'ammonium) sont coulés avec ou sans substrat ajouté. Un gel d'entassement de 4,67 % polyacrylamide (4,549 % acrylamide, 0,121

% bis-acrylamide, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,25 % TEMED, 0,05 % persulfate d'ammonium) est appliqué au-dessus du gel de résolution. Les gels et le montage de l'appareil se font de la façon décrite par le manufacturier et le système de tampon Laemmli est utilisé. (Laemmli, U.K., 1970).

L'électrophorèse débute par 5 min à 250 V pour permettre aux protéines d'entrer rapidement dans le gel d'entassement et ainsi éviter la diffusion des protéines. Les étapes suivantes sont de 10 min à 150 V dans le gel d'entassement et de 45 min à 200 V dans le gel de résolution. Lors de la migration, l'appareil à électrophorèse est placé dans une chambre à 4°C en vue de minimiser l'accumulation de chaleur dans les gels, causé par le passage du courant électrique. Pour la même raison, les réservoirs supérieur et inférieur de l'appareil sont remplis avec du tampon d'électrophorèse froid (Système de tampon Laemmli, Laemmli, U.K., 1970).

### **Élimination du SDS**

Après l'électrophorèse, les gels sont baignés dans 100 ml de solution de rinçage (20 % 2-propanol dans 50 mM Tris-HCl pH 8,0) avec agitation continue pour 1 heure en changeant la solution une fois. Les gels sont ensuite transférés dans 100 ml de Tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) et baignés pour 1 heure avec agitation continue et en changeant la solution une fois.

### **Dénaturation**

Les gels sont incubés pour 1 heure avec agitation constante dans 30 ml de solution de dénaturation (Tampon A contenant 6 M guanidine-HCl) en changeant la solution une fois durant l'incubation.

## **Renaturation**

Les protéines sont renaturées à 4°C, en incubant les gels dans 250 ml de solution de renaturation (Tampon A contenant 0,04 % Tween 20™) et en changeant le tampon aux 20 min durant 1 heure. Les gels sont ensuite baignés durant 16 heures à agitation constante dans les derniers 250 ml de solution de renaturation, toujours à 4°C.

## **Essai kinase**

Le matin suivant, les gels sont pré-incubés dans 100 ml de tampon Hepes (30 mM Hepes-HCl pH 7,5) pour 30 min à température de la pièce, puis dans 10 ml de tampon kinase (30 mM Hepes-HCl pH 7,5, 2 mM DTT, 10 mM Acétate de magnésium, 10 mM Chlorure de manganèse) pour 2 heures. L'essai kinase est amorcé en ajoutant 50 µCi de [<sup>32</sup>P] γ ATP par gel et la réaction se poursuit pour 1 heure.

## **Détection**

La radioactivité non-incorporée est éliminée par plusieurs bains dans la solution de lavage (5 % (p/v) TCA, 1 % (p/v) sodium pyrophosphate). De façon générale, 5 lavages de 30 min dans 100 ml de solution de lavage sont suffisants. Les gels sont ensuite baignés pour 30 min dans une solution de 3 % glycérol puis séchés entre deux membranes de cellophane pour une nuit. Le lendemain, les gels sont exposés sur un film à autoradiographie Biomax de Kodak, de 1 à 4 heures à -80°C ou pour la nuit à température de la pièce.

### **2.2.11 Analyse des acides aminés phosphorylés**

Le protocole d'analyse des acides aminés phosphorylés est celui qui fut mis au point par Kamps et Sefton (1989) à l'exception de l'électrophorèse qui est remplacée par une chromatographie en couche mince telle que décrite par Duclos, B. et al (1991).

### **Essai kinase in vitro**

Pour ce faire, un essai kinase in vitro est effectué en combinant 30  $\mu\text{L}$  de tampon kinase (30 mM Hepes-HCl pH 7,5, 2 mM DTT, 10 mM Acétate de magnésium, 10 mM Chlorure de manganèse) contenant 0,7 % de triton X-100, 5  $\mu\text{Ci}$  de  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP et 2  $\mu\text{g}$  de protéines de la fraction particulaire d'ovaires cueillis 96 heures suivant une pollinisation compatible (voir protocole d'extraction à la section 2.2.8). La réaction est placée à 30°C pour 30 minutes puis est arrêtée en ajoutant un demi-volume de tampon d'échantillon 3X (0,1875 M Tris-HCl pH 6,8, 30 % glycérol, 2.145 M  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,1 % Bleu de bromophénol).

### **Transfert de type Western**

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (voir section 2.2.10) est ensuite effectuée sur chacun des échantillons et le patron de protéines obtenu est transféré sur membrane de PVDF (PVDF-Plus, MSI, Westboro, MA) selon les instructions du fabricant du système Mini Trans-Blot® (Bio Rad, Hercules, CA). Suivant le transfert, la membrane est exposée contre un film à autoradiographie Biomax de Kodak. Après avoir développé le film d'autoradiographie, une bande d'intérêt peut être prélevée à l'aide d'un scalpel sur la membrane de PVDF et analysée pour en connaître la composition en acides aminés phosphorylés.

### **Analyse des acides aminés phosphorylés**

La membrane de PVDF prélevée est placée dans un tube eppendorf à capuchon vissant étanche et traitée avec 200  $\mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique 6 M pour une heure, à 110°C. Les membranes de PVDF sont spécialement reconnues pour bien tolérer ce traitement drastique qui a pour but d'hydrolyser les protéines en acides aminés. Après une heure, la membrane de PVDF est retirée du tube et la solution d'acide chlorhydrique est concentrée au Speed Vac Plus (SC110A, Savant) jusqu'à ce qu'il ne reste qu'environ 5  $\mu\text{L}$ . La demi de ce volume (environ 2,5  $\mu\text{L}$ ) est prélevé à l'aide d'un capillaire et

appliqué sur une plaque pour chromatographie en couche mince faite de cellulose, de dimension 20 cm X 4 cm (Sigmacell, type 100, 100 µm). Des échantillons d'un microgramme de phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosine non-radioactifs sont également appliqués sur la plaque de chromatographie pour servir de standard. La migration est effectuée dans une chambre de verre avec comme solvant de migration un mélange de 5 parts d'acide isobutyrique pour 3 parts d'hydroxyde d'ammonium 0,5 M. Après environ 4 heures, la plaque de chromatographie est retirée de la chambre. Une solution de ninhydrine (0,6 %) est vaporisée sur la plaque afin de révéler les standards puis la plaque est exposée pour environ 12 heures à température de la pièce contre un film à autoradiographie Biomax de Kodak.

### 2.2.12 Marquage métabolique

Des ovaires de fleurs de *S. chacoense* sont disséqués afin d'en extraire les ovules. En général, les ovules de 5 ovaires sont utilisés pour chaque réaction (5 ovaires pour la réaction de marquage et 5 ovaires pour la réaction contrôle).

La réaction de marquage est effectuée sur une lame de verre. Les ovules sont humectés avec 45 µL d'eau distillée à laquelle est ajouté 5 µL de L-[<sup>35</sup>S]-méthionine (50 µCi). La lame de verre est placée dans un plat fermé afin de diminuer l'évaporation. La réaction contrôle se fait de la même façon sauf que les 5 µL de L-[<sup>35</sup>S]-méthionine sont remplacés par 5 µL d'eau distillée.

Les ovules sont incubés ainsi à température de la pièce, pour 1h30 en prenant soin qu'ils ne sèchent pas. Les ovules sont ensuite rincés plusieurs fois à l'eau distillée et on procède à l'extraction des protéines.

### 2.2.13 Extraction des protéines marquées

Les ovules sont transférés dans un tube Eppendorf, gelés dans l'azote liquide puis broyés, à l'aide d'un micropilon, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. On ajoute alors 100  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction (0,05 M Tris-HCl pH 8, 0,01 M EDTA, 0,001 M DTT, 0,05 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,05 M PMSF) et on agite légèrement pour permettre à la poudre gelée de bien se mélanger au tampon d'extraction. On centrifuge 10 min à 12 000 g dans une centrifugeuse Eppendorf à 4°C afin de culotter le matériel non-soluble. Après avoir recueilli un aliquot de 5  $\mu\text{L}$  afin d'évaluer la concentration en protéine de la façon décrite à la section 2.2.9, le surnageant est gelé rapidement dans l'azote et conservé à -80°C.

### 2.2.14 Traduction *In Vitro*

Les réactions de traduction ont été faites avec le système de traduction au germe de blé de Boehringer Mannheim Biochemica (Anderson, C.W. *et al.* 1983). Chaque réaction de traduction a été réalisée avec 1  $\mu\text{g}$  d'ARNm, en présence d'acétate de potassium (100 mM final) et d'acétate de magnésium (1 mM) ainsi que 25  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{35}\text{S}$ ] L-méthionine, dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Une réaction témoin, ne contenant pas d'ARNm était également effectuée à chaque lot de traduction. Chaque réaction est incubée à 30°C pour 1 heure puis un aliquot de 3  $\mu\text{L}$  est recueilli afin d'évaluer le rendement de la réaction en calculant le pourcentage d'incorporation de l'acide aminé radioactif et la stimulation de la réaction selon les instructions données par le manufacturier. Immédiatement après avoir recueilli l'aliquot, le reste de la réaction est gelé rapidement dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

### 2.2.15 Électrophorèse bi-dimensionnelle

Les protéines obtenues par traduction *in vitro* ont été analysées par électrophorèse bi-dimensionnelle. Les deux dimensions d'électrophorèse ont été réalisées avec le

système Mini-Protean de BioRad, selon les directives du manufacturier. Dans tous les cas, un nombre égal de cpm, tel que déterminé dans l'évaluation du rendement de la réaction, a été appliqué sur chaque gel.

### **2.2.15.1 Électrophorèse sur gel à gradient de pH non-équilibré (NEPHGE)**

Cette technique d'électrophorèse est une alternative à la focalisation isoélectrique pour la première dimension, qui permet d'obtenir une meilleure résolution des protéines basiques (O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. et O'Farrell, P.H., 1977). Cette première dimension sépare les protéines de façon empirique, selon leur point isoélectrique, sur un gradient s'étendant environ de 3,5 à 10 unités de pH (O'Farrell, P.Z. et al., 1977).

Des gels de polyacrylamide (9,2 M urée, 4 % acrylamide, 2 % Triton X-100, 4 % Pharmalyte 3/10, 0,016 % persulfate d'ammonium, 0,16 % TEMED) de 5,5 cm de longueur sont coulés par capillarité dans des cylindres de verre. Il est à noter que les gels de NEPHGE sont difficiles à polymériser et nécessitent un temps minimum de dégazage de la solution de monomères de 15 min et une polymérisation d'une heure. Après polymérisation, le montage de l'appareil est effectué selon les directives du manufacturier (BioRad, Hercules, CA). Quinze gels peuvent être chargés à la fois. Un adaptateur neuf est utilisé pour chaque nouvelle électrophorèse afin d'éviter les risques de fuites. Il est à noter que les tampons d'électrophorèse supérieur et inférieur sont inversés comparativement à un IEF (supérieur = 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, inférieur = 0,1 M NaOH). Le haut de chaque gel est rincé avec du tampon supérieur d'électrophorèse pour enlever tous résidus pouvant obstruer la migration des protéines. Les bassins supérieurs et inférieurs sont respectivement remplis avec les tampons supérieur et inférieurs d'électrophorèse, ayant au préalable été refroidis et dégazés au moins 20 minutes.

Un volume de tampon d'échantillon de première dimension (9,5 M urée, 2 % Triton X-100, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1,6 % Bio-lyte 5/7, 0,4 % Bio-lyte 3/10) est ajouté à chaque échantillon 5 min avant de le charger sur le gel. Le chargement est effectué en portant une attention spéciale à ne pas insérer de bulles d'air dans le capillaire. L'échantillon est ensuite recouvert de 45  $\mu$ L de tampon de recouvrement (9 M urée, 0,8 % Bio-lyte 5/7, 0,2 % Bio-lyte 3/10, 2,5 mM Bleu de bromophénol) dilué au besoin, de façon à avoir une densité intermédiaire entre celle de l'échantillon et celle du tampon supérieur d'électrophorèse.

L'électrophorèse se fait en courant inversé comparativement au IEF (branchement rouge sur noir). L'électrophorèse débute par 20 min à 200 V suivi de 20 min à 300 V puis 2h45 à 400 V pour un total de 1266 V/heure. Une pré-électrophorèse n'est pas nécessaire. L'électrophorèse est effectuée dans une chambre réfrigérée à 4°C afin de minimiser l'accumulation de chaleur dans les gels causée par le passage du courant.

Après l'électrophorèse, les gels sont délicatement poussés hors du tube de verre à l'aide d'une seringue remplie de tampon d'électrophorèse de seconde dimension. Les gels sont ensuite étalés sur une bande de pellicule parafilm™, puis recouverts de 50  $\mu$ L de tampon d'échantillon Laemmli (0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % glycérol, 0,715 M  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,05 % Bleu de bromophénol) et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation dans la seconde dimension.

### **2.2.15.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes**

La seconde dimension d'électrophorèse se fait sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Des gels de séparation de 1 mm d'épaisseur et 12,5 % de polyacrylamide sont faits à partir de 5 ml de solution de monomères. Un gel d'entassement de 4,67 % polyacrylamide est coulé sur le dessus. Les solutions de monomères, les conditions de migration ainsi que l'appareil utilisé sont les mêmes que ceux mentionnés à la section 2.2.10.

### **2.2.15.3 Traitements post-électrophorèse**

#### **Coloration au bleu de Coomassie**

La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol franchi le bas du gel. Les gels sont alors démontés et mis à colorer pour 1 heure avec agitation dans une solution de fixation (45 % méthanol, 10 % acide acétique) contenant 2,5 g/L de bleu de Coomassie R250. Cette coloration est nécessaire pour révéler le marqueur de poids moléculaire. Les gels sont ensuite rincés quelques fois avec la solution de fixation seule puis mis à décolorer pour la nuit dans la solution de fixation. La présence d'une éponge dans le bassin aide à la décoloration en liant le colorant.

#### **Traitement au Enhance™**

Étant donné le faible taux de radiation traversant le gel, la fluorographie est nécessaire pour éviter des temps d'exposition trop long. Les gels sont donc traités au Enhance (NEN Research Products) pour 1 heure, selon les directives du manufacturier, dès leur sortie de la solution de fixation.

#### **Séchage sur pellicule de cellophane et autoradiographie**

Les gels sont ensuite agités pour 30 minutes dans une solution de 3 % (p/v) glycérol puis mis à sécher pour la nuit entre deux pellicules de cellophane. Une fois secs, les gels sont exposés sur film Kodak Biomax pour 2 semaines à -80°C.

### **2.2.16 Visualisation des tubes polliniques au bleu d'aniline**

Des fleurs entières de *S. chacoense* sont recueillies et plongées immédiatement dans une solution de fixation Carnoy (Acide acétique:éthanol, 1:3). Les fleurs doivent demeurer dans la solution de Carnoy un minimum de 24 heures pour permettre une

fixation complète des tissus. Lorsque la fixation est complète, les fleurs sont délicatement rincées plusieurs fois à l'eau distillée. On procède ensuite avec un bain d'une heure à 60°C dans une solution de 8 M NaOH. Les fleurs sont ensuite rincées délicatement avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de rinçage atteigne un pH presque neutre. Chacune des fleurs sont alors disséquées dans l'eau pour isoler leur carpelle. Les carpelles sont déposés sur une lame de verre, sur une goutte de solution de bleu d'aniline. Les lames sont montées en compressant délicatement les carpelles entre la lame de verre et une lamelle. Les tubes polliniques peuvent être visualisés immédiatement par microscopie à épifluorescence en utilisant un microscope Leitz Ortholux II (Ernst Leitz GMBH, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un filtre de type G (excitation entre 350 et 460 nm).

### **2.2.16.1 Préparation de la solution de bleu d'aniline**

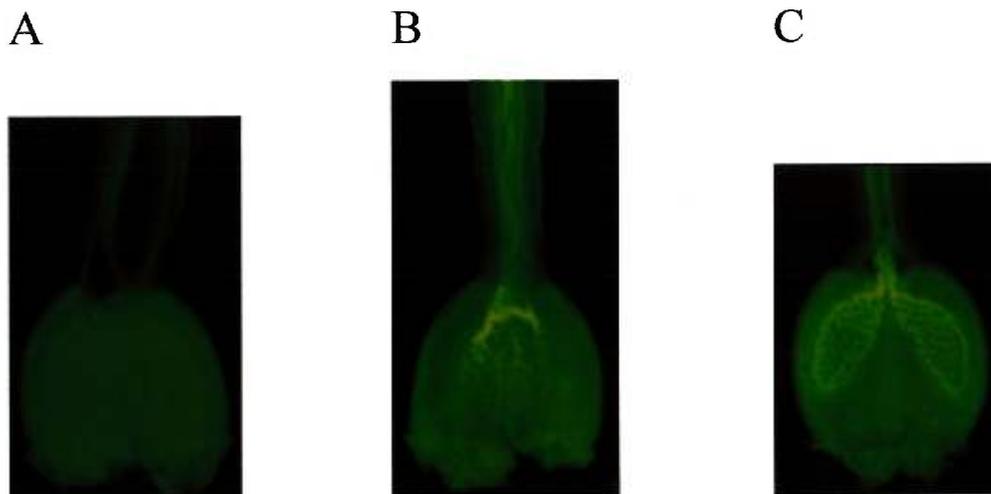
Une solution 0,1 % bleu d'aniline dans 0,15 M  $K_3PO_4$  (248,31 g/mol) est préparée à partir d'une solution stock 1 % (p/v) bleu d'aniline dans l'eau. La solution doit être conservée au moins deux jour à 4°C et à l'obscurité avant d'être utilisée.

## 3.0 Résultats

---

### 3.1 Croissance des tubes polliniques

La vitesse de croissance des tubes polliniques peut varier d'une espèce de plante à une autre et sous différentes conditions de culture. Afin de déterminer avec précision combien de temps s'écoule entre la pollinisation et l'entrée des tubes polliniques dans l'ovaire, nous avons observé la croissance des tubes polliniques de *S. chacoense* par microscopie à épifluorescence. La figure 5 montre les résultats obtenus au cours de cette expérience. Les tubes polliniques y sont visibles en jaune. Il a été déterminé que la plupart des tubes polliniques parviennent à l'ovaire environ 36 heures suivant la pollinisation. Ceci nous a permis d'estimer que 48 heures suivant la pollinisation, la fécondation de la majorité des ovules a eu lieu.



**Figure 5:** Croissance des tubes polliniques de *S. chacoense* observée par microscopie à épifluorescence.

Les tubes polliniques sont visibles en jaune.

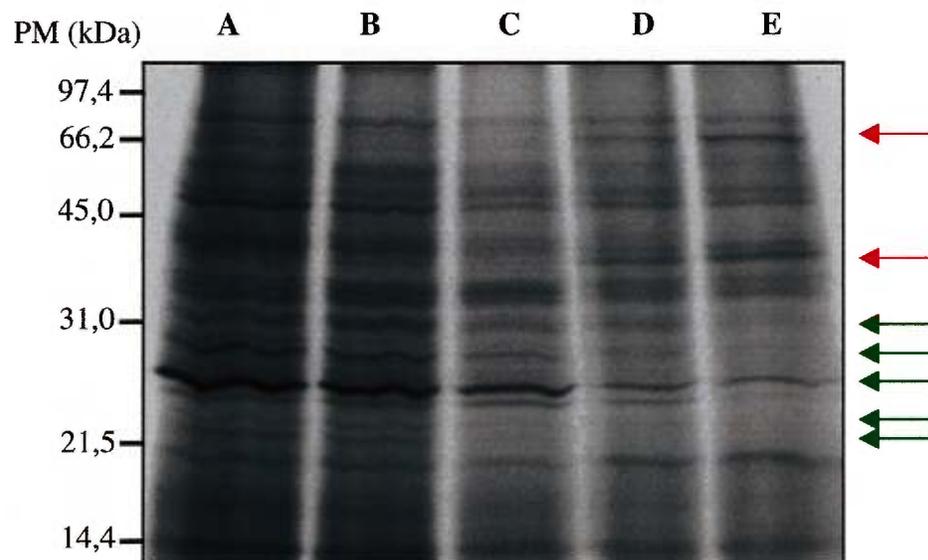
**A:** Sans pollinisation

**B:** 36 heures suivant la pollinisation

**C:** 48 heures suivant la pollinisation

### 3.2 Marquage métabolique

Des expériences préliminaires de marquage métabolique *in vivo* des protéines néosynthétisées ont été réalisées sur des ovules de *S. chacoense* recueillis à différents intervalles de temps suivant la pollinisation. Pour ce faire, des ovules retirés de l'ovaire ont été incubés dans une solution aqueuse contenant un acide aminé radioactif, la L-[<sup>35</sup>S]-méthionine. Les protéines néosynthétisées au niveau de ces ovules au cours de l'incubation, peuvent avoir incorporées une méthionine radioactive et devenir ainsi détectable par autoradiographie. La figure 6 montre les résultats obtenus au terme du marquage métabolique.



**Figure 6:** Marquage métabolique des protéines néosynthétisées à différents intervalles de temps suivant la pollinisation.

Des ovules provenant de carpelles de *S. chacoense* ont été incubés dans une solution aqueuse de L-[<sup>35</sup>S]-Méthionine pendant une heure et demi. Après plusieurs rinçages, les protéines de la fraction soluble ont été extraites puis analysées par SDS-PAGE 12,5 %. A: Contrôle (sans pollinisation). B: 24 heures suivant une pollinisation compatible. C: 48 heures suivant une pollinisation compatible. D: 72 heures suivant une pollinisation compatible. E: 96 heures suivant une pollinisation compatible.

On remarque que plusieurs bandes de protéines, identifiées par une flèche verte, diminuent d'intensité, alors que les bandes de protéines identifiées par une flèche rouge augmentent d'intensité. Ces expériences nous ont permis de constater qu'il était possible de détecter des changements au niveau de la quantité de certaines protéines néosynthétisées au cours des 96 heures suivant la pollinisation.

### **3.3 Analyse des protéines traduites *in vitro* par électrophorèse bi-dimensionnelle.**

L'expérience de marquage métabolique nous a confirmé qu'il est possible de détecter des variations au niveau de la quantité de protéines néosynthétisées au niveau des ovules. Toutefois, la résolution que nous obtenons avec une seule dimension d'électrophorèse (SDS-PAGE) n'est pas parfaite et il serait très difficile, de cette façon, d'obtenir une bande de protéine suffisamment isolée pour en déterminer la séquence en acide aminé. Les bandes de protéines obtenues après une seule dimension d'électrophorèse se chevauchent toutes les unes les autres et sont toutes composées de plusieurs variétés de protéines. Une méthode alternative a donc dû être essayée pour augmenter la séparation des protéines. C'est l'électrophorèse bi-dimensionnelle qui a été retenue.

Deux types différents d'électrophorèse ont été essayés comme première dimension: la focalisation isoélectrique et l'électrophorèse sur gradient de pH non-équilibré (NEpHGE). Dans tous les cas, la seconde dimension était un SDS-PAGE. La meilleure séparation a été obtenue avec la technique de NEpHGE qui permet une meilleure résolution des protéines basiques et c'est cette technique seule qui a été retenue pour le reste des essais.

Des ovaires de fleurs de *S. chacoense* non-pollinisées et pollinisées de façon compatible depuis 24, 30, 48 et 96 heures ont été utilisés comme matière première pour l'analyse des protéines traduites *in vitro* par électrophorèse bi-dimensionnelle. L'utilisation d'ovaires entiers a été privilégiée aux ovules parce que la dissection des ovaires pour en extraire les ovules demande beaucoup de temps et donne trop peu de

matériel pour le nombre d'essai nécessaire à la mise au point des électrophorèse bi-dimensionnelle.

Les ARNm ont été extraits des carpelles de la façon décrite aux sections 2.2.1 à 2.2.4. Des protéines ont été traduites *in vitro*, à partir de ces ARNm, en présence de L-[<sup>35</sup>S]-méthionine. Les protéines obtenues sont donc marquées radioactivement et sont représentatives des ARNm présents dans le carpelle à un temps donné. Chaque groupe de réactions de traduction est fait en parallèle avec une réaction contrôle ne contenant pas d'ARNm. Le rendement de chaque réaction de traduction a été évalué en calculant le pourcentage d'incorporation de la méthionine marquée ainsi que le pourcentage de stimulation de la réaction. Plusieurs facteurs influencent l'efficacité de l'incorporation, entre autres la concentration d'ARNm, le temps d'incubation ainsi que la présence d'ions magnésium et potassium. Le tableau I montre les valeurs de stimulation et d'incorporation moyennes obtenues lors de 25 différentes réactions de traduction. Le rendement obtenu avec les ARNm de *S. chacoense* est comparé avec celui obtenu avec des ARNm du virus de la mosaïque du tabac (TMV) qui étaient fournis par le manufacturier comme contrôle du rendement.

Type d'ARNm utilisé	Incorporation de la L-[ <sup>35</sup> S]-méthionine (%)	Stimulation de la traduction
<i>S. chacoense</i>	0,86	28
TMV (Contrôle)	1,89	23

**Tableau I:** Rendement moyen obtenu lors des réactions de traduction *in vitro*.

Les produits de traduction ont été analysés par électrophorèse bi-dimensionnelle. Au moins cinq électrophorèses différentes ont été effectuées pour chaque temps. La figure 7 montre les résultats les plus représentatifs obtenus lors de ces expériences pour deux intervalles de temps plus un contrôle sans pollinisation.

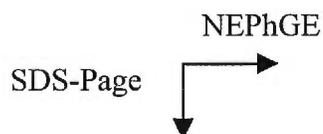
**Figure 7:** Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle, des protéines traduites *in vitro*.

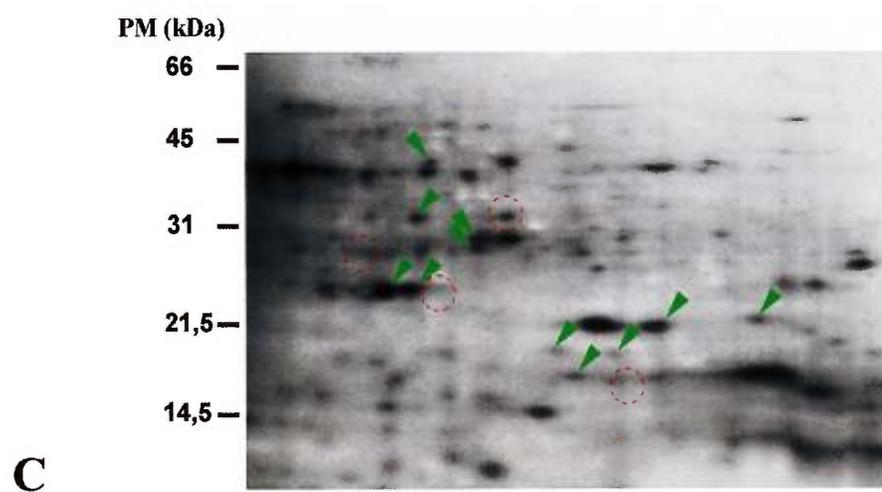
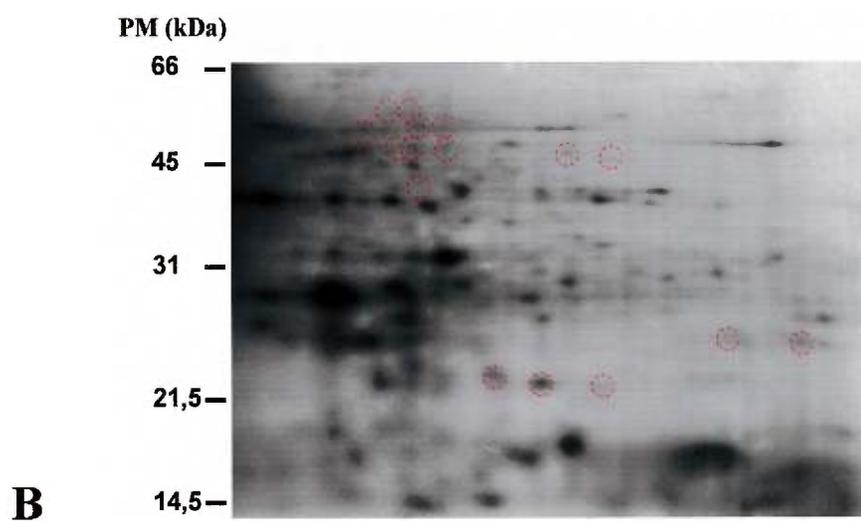
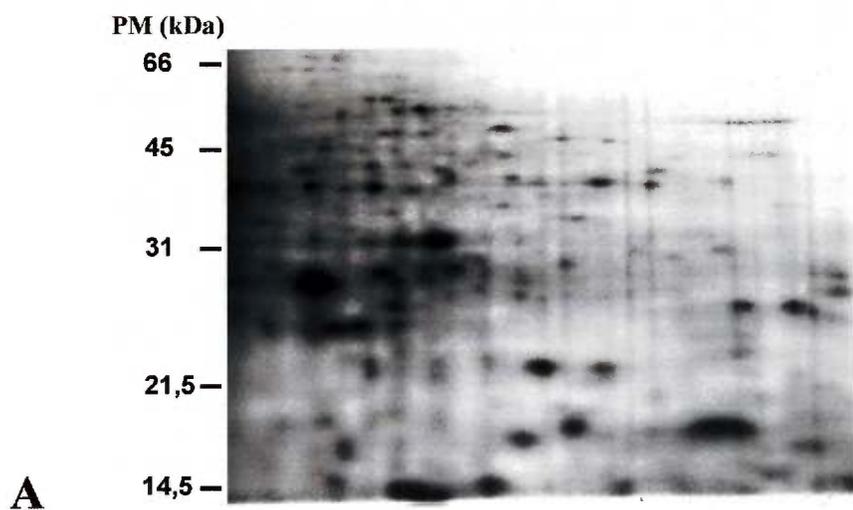
Des ARNm, extraits de carpelles recueillis 24, 30, 48 et 96 heures suivant une pollinisation compatible ou sans pollinisation (contrôle), ont été utilisés lors d'une traduction *in vitro* en présence de L-[<sup>35</sup>S]-Méthionine. Les protéines ainsi obtenues ont été analysées par électrophorèse bi-dimensionnelle de type NEpHGE. Flèche verte: polypeptide dont l'intensité augmente. Cercle rouge: polypeptide dont l'intensité diminue. Gauche: Côté acide. Droite: Côté basique.

**A:** Sans pollinisation (contôle)

**B:** 48 heures suivant la pollinisation

**C:** 96 heures suivant la pollinisation





Chacun des trois patrons d'électrophorèse permet de distinguer nettement environ une centaine de polypeptides différents représentant chacun un produit de traduction *in vitro* à partir d'un ARNm présent dans le carpelle au temps indiqué. On remarque que la résolution est nettement supérieure qu'après une seule dimension d'électrophorèse. Si on compare le patron obtenu avant pollinisation (contrôle) à ceux obtenus 48 et 96 heures suivant la pollinisation, on constate que les patrons contrôle et 48 heures sont très similaires mais qu'après 96 heures, bien que certains points de repères soient toujours présents, le patron d'électrophorèse est nettement transformé. Les flèches vertes montrent les polypeptides qui augmentent d'intensité avec le temps alors que les cercles rouges indiquent ceux qui diminuent d'intensité. Après 96 heures, on observe l'apparition ou l'augmentation d'intensité d'au moins onze polypeptides et la diminution d'intensité ou la disparition de 19 polypeptides comparativement au patron obtenu avant pollinisation.

### 3.4 Essais kinase en gel

Puisque le but de mon projet de recherche était d'étudier les protéines kinases, l'étape suivante a été de savoir si certaines de ces protéines démontrent une activité de phosphorylation. Les protéines présentes au niveau du carpelle de *S. chacoense*, de 0 à 96 heures suivant une pollinisation compatible, ont donc été analysées par un essai kinase en gel. Plusieurs raisons nous ont poussées à choisir cette technique. Premièrement, elle nous permet d'identifier, dans un échantillon de protéines totales, des protéines démontrant une activité de phosphorylation. La possibilité d'effectuer l'essai, en parallèle, sur des échantillons de protéines provenant de tissus recueillis différents temps suivant la pollinisation nous permettrait aussi de localiser des protéines kinase donc l'activité serait régulée en réponse aux événements suivant la pollinisation ou à la fécondation. Il est également possible d'ajouter différents substrats au gel SDS-PAGE, ce qui permet d'identifier des protéines dont l'activité de phosphorylation est spécifique à un substrat donné. Enfin, le niveau de détection de cet essai est suffisamment élevé pour que nous puissions éventuellement nous en servir lors d'étapes de purification de protéines, comme test de localisation. En effet, l'essai kinase a été utilisé avec succès lors d'un essai préliminaire de purification à l'aide du système Mini Prep Cell de BioRad. Ce système de purification repose sur

une élution électrophorétique continue sur un gel de polyacrylamide. Le patron d'élution varie en fonction du pourcentage d'acrylamide ainsi que de la présence de SDS dans le gel de séparation. Des protéines kinases extraites d'ovaires de *S. chacoense* ont pu être ainsi séparées selon leur poids moléculaire et détectées grâce à l'essai kinase.

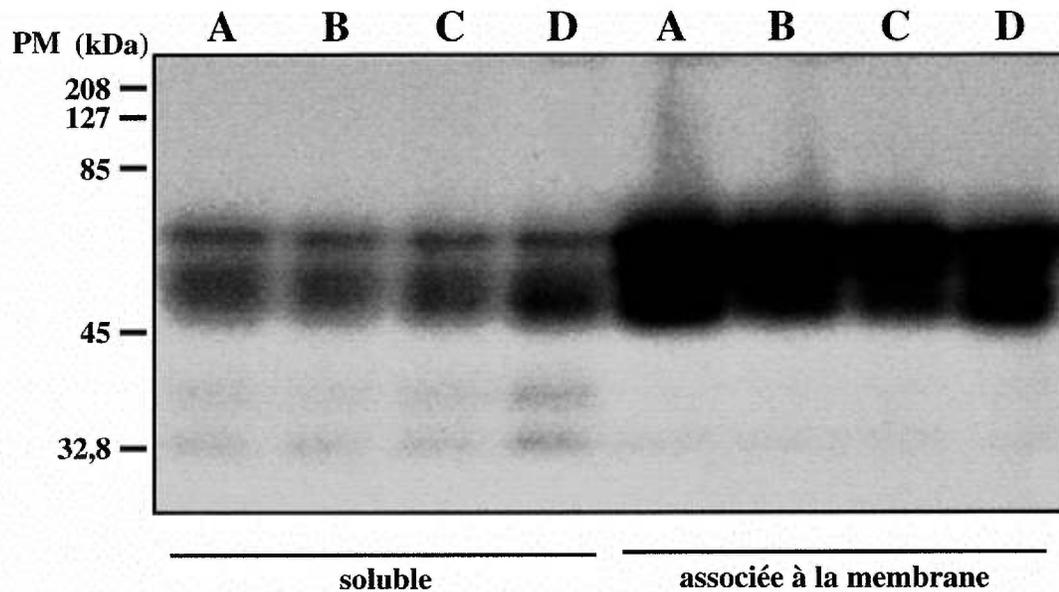
Des essais kinase en gel ont été utilisés par Kameshita et Fujisawa en 1989 pour étudier l'activité kinase des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la CaM-kinase II. Cette technique repose sur le principe que, suivant la dénaturation occasionnée par la séparation sur SDS-PAGE, les protéines kinases peuvent être renaturées de façon à retrouver une partie de leur activité enzymatique. Plusieurs tentatives ont été faites pour réussir un essai kinase en gel sur un gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle, mais tous les efforts sont demeurés sans succès. Il semble que la présence d'urée dans le gel de première dimension empêche une reprise de l'activité enzymatique des protéines kinases. Toutefois, les figures 8 à 11 montrent les résultats obtenus lors d'essais kinase sur des gels d'une dimension, soit une séparation par la taille sur SDS-PAGE.

Les protéines des fractions solubles et membranaires ont été analysées séparément et trois différents substrats, utilisés couramment pour les protéines kinase, ont été essayés: l'histone H1, la caséine et la myelin basic protein (MBP).

### 3.4.1 Autophosphorylation

La figure 8 montre le niveau d'autophosphorylation, c'est-à-dire l'activité kinase présente sans substrat ajouté. Cette figure représente en quelque sorte le bruit de fond présent lors de toutes les expériences d'activité kinase réalisées en ajoutant des substrats. On remarque que plusieurs bandes d'activité kinases (situées entre 45 et 65 kDa) démontrent une forte activité d'autophosphorylation. Trois bandes d'activité kinase présentes dans la fraction soluble semblent être induites 96 heures suivant la pollinisation (voir bandes situées à environ 33, 40 et 50 kDa).

## Autophosphorylation



**Figure 8:** Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et associées à la membrane, de carpelle de *S. chacoense*, tel que déterminé par un essai kinase en gel sans substrat ajouté.

Les protéines des fractions solubles et associée à la membrane ont été séparées selon leur poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE 12,5 %. Suivant la migration, les protéines contenues dans le gel ont été complètement dénaturées par un traitement au 6 M guanidine hydrochloride puis lentement renaturées afin de permettre leur repliement dans une conformation active.

**A:** Sans pollinisation

**B:** 24 heures après une pollinisation compatible

**C:** 48 heures après une pollinisation compatible

**D:** 96 heures après une pollinisation compatible

### 3.4.2 Histone H1

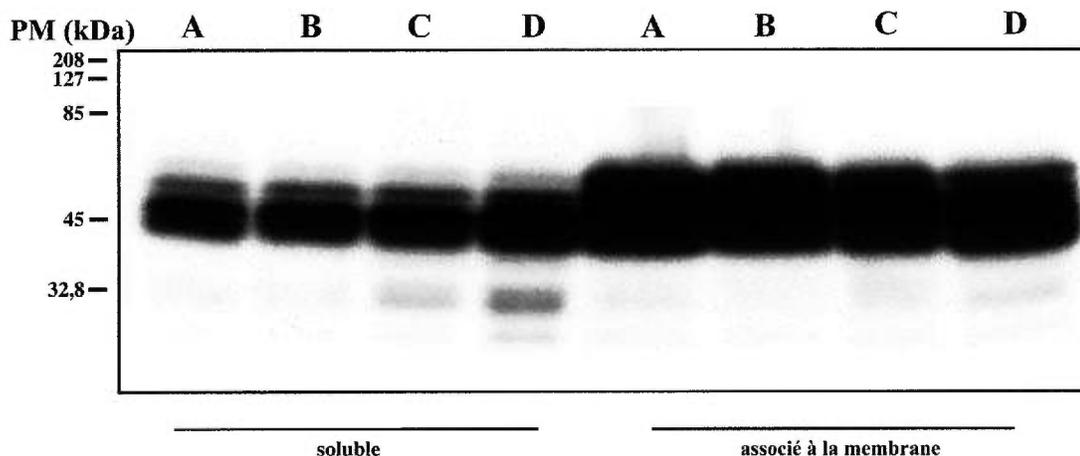
La figure 9 montre l'activité kinase des protéines du carpelle de *S. chacoense* en présence du substrat histone H1. L'histone H1 est une protéine basique souvent utilisée comme substrat pour tous les types de protéines kinase. Lorsqu'on compare avec l'essai d'autophosphorylation, on remarque que, de façon générale, l'activité kinase semble être augmentée en présence de l'histone H1 et ce, bien que les quantités de protéines et de  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP ainsi que les temps d'exposition soient les mêmes pour les deux essais. On remarque également que plusieurs bandes de protéines de la fraction membranaire, situées entre 30 et 40 kDa, apparaissent de façon nettement plus marquée avec l'histone H1. De plus, une bande d'activité kinase d'environ 38 kDa, située dans la fraction soluble, démontre une augmentation d'activité, 96 heures suivant la pollinisation.



### 3.4.3 Protéine basique de la myéline (MBP)

La figure 10 montre l'activité kinase des protéines présentes au niveau du carpelle de *S. chacoense* en présence du substrat MBP. La myelin basic protein est un substrat qui est souvent utilisé pour les protéines de type MAPK. Il est à noter que la concentration de substrat utilisé respecte les recommandations du fabricant. On remarque clairement qu'en présence du substrat MBP, deux bandes distinctes (30 et 33 kDa), situées dans la fraction soluble, démontrent une augmentation de leur activité kinase avec le temps. La bande à 33 kDa apparaît 48 heures après la pollinisation (donc juste après la fécondation) et continue d'augmenter jusqu'à 96 heures suivant la pollinisation. La bande d'activité kinase située à 30 kDa n'apparaît nettement qu'à 96 heures suivant la pollinisation. Le maximum d'activité kinase est observé 96 heures suivant la pollinisation pour les deux bandes.

## Myelin basic protein (MBP)



**Figure 10:** Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et membranaires de carpelle de *S. chacoense* tel que déterminé par un essai kinase en gel en ajoutant le substrat MBP.

Le substrat MBP (0,25 mg/ml) a été incorporé au gel SDS-PAGE 12,5 % avant sa polymérisation. Les protéines des fractions solubles et associées à la membrane ont été séparées selon leur poids moléculaire sur le gel SDS-PAGE contenant la MBP. Suivant la migration, les protéines contenues dans le gel ont été complètement dénaturées par un traitement au 6 M guanidine hydrochloride puis lentement renaturées afin de permettre leur repliement dans une conformation active.

- A:** Sans pollinisation
- B:** 24 heures après une pollinisation compatible
- C:** 48 heures après une pollinisation compatible
- D:** 96 heures après une pollinisation compatible

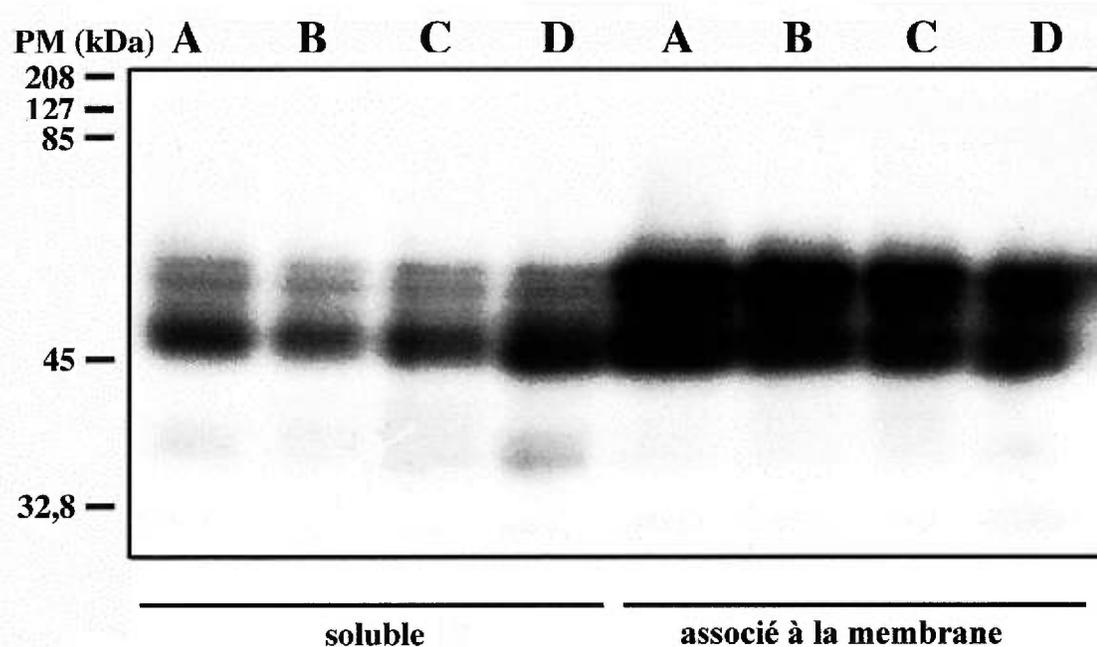
### 3.4.4 Caséine

La figure 11 montre l'activité kinase présente en présence du substrat caséine. Trois différentes bandes d'activité kinase (38, 40 et 46 kDa) de la fraction soluble démontrent une augmentation de leur activité kinase. Ces trois bandes n'apparaissent que 96 heures après la pollinisation.

Globalement, les patrons de bandes kinases obtenus avec les trois substrats ainsi que sans substrat ajouté sont très similaires. On remarque, dans tous les cas, que toutes les bandes démontrant de l'activité kinase sont situées entre 30 et 65 kDa. Ceci est, en soit, peu surprenant puisque ces tailles correspondent aux tailles moyennes des protéines kinases exprimées au niveau des organes reproducteurs et du pollen chez les plantes (**ADK1**, 36.7 kDa, Ali, N. et al., 1994; **ARK1** 96 kDa, Tobias, C.M. et al., 1992; **Ca<sup>2+</sup>-dependantes** 60 et 69 kDa, Kunz, C. et al. 1996; **LePRK-1 et -2**, 75 et 70 kDa, Muschietti, J. et al., 1998; **PRK1** 69 kDa, Mu, J.H. et al., 1994; **p45<sup>Nt4</sup>** 45 kDa, Wilson, C. et al., 1997; Bianchi, M.W. et al., 1994; **CDPK** 60 kDa, Estruch, J.J. et al., 1994; pour une moyenne, tous types de kinases confondus de 64,5 kDa). Il aurait été intéressant d'obtenir une meilleure résolution de ces bandes en diminuant, par exemple, le pourcentage d'acrylamide contenu dans les gels. Malheureusement, la manipulation prolongée des gels de polyacrylamide nécessaire pour effectuer les essais kinase en gel, nous oblige à utiliser des gels contenant environ 12 % d'acrylamide.

On remarque également que les bandes démontrant la plus forte activité kinase sont accolées entre 45 et 65 kDa. C'est d'ailleurs au niveau de ces mêmes poids moléculaires que sont concentrées les seules bandes d'activités kinase présentes au niveau des fractions particulières et ce, pour tous les substrats utilisés sauf l'histone H1. De façon générale, l'histone H1 est le substrat pour lequel les bandes kinases sortent de façon plus marquée. Plusieurs bandes démontrent une augmentation de l'activité kinase 48 ou 96 heures après la pollinisation..

## Caséine



**Figure 11:** Activité kinase présente à différents intervalles de temps dans les fractions de protéines solubles et membranaires de carpelle de *S. chacoense* tel que déterminé par un essai kinase en gel en ajoutant le substrat caséine.

Le substrat caséine (1 mg/ml) a été incorporé au gel SDS-PAGE 12,5 % avant sa polymérisation. Les protéines des fractions solubles et associée à la membrane ont été séparées selon leur poids moléculaire sur le gel SDS-PAGE contenant la caséine. Suivant la migration, les protéines contenues dans le gel ont été complètement dénaturées par un traitement au 6 M guanidine hydrochloride puis lentement renaturées afin de permettre leur repliement en conformation active.

- A:** Sans pollinisation
- B:** 24 heures après une pollinisation compatible
- C:** 48 heures après une pollinisation compatible
- D:** 96 heures après une pollinisation compatible

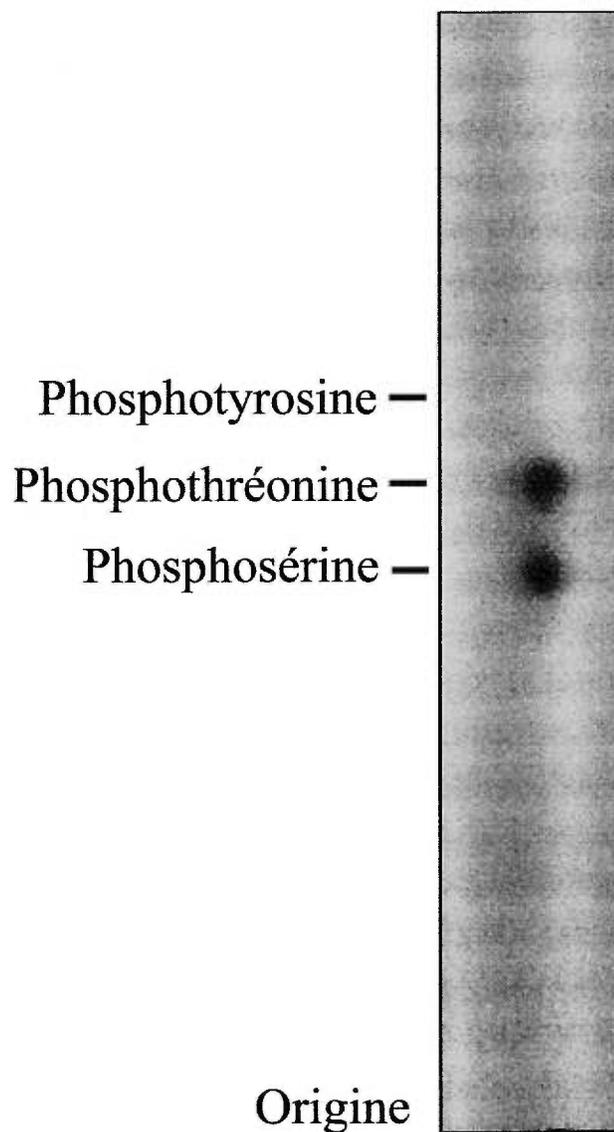
### 3.5 Analyse des acides aminés phosphorylés

Certaines bandes d'activité kinase qui semblaient particulièrement prometteuses ont été analysées afin de confirmer qu'elles étaient bien produites par une activité de phosphorylation (liaison covalente d'un groupement phosphate) et non pas seulement le fruit de la liaison faible de molécules d'ATP. Ces analyses permettent également de connaître quelle est la composition en acides aminés phosphorylés. Pour réaliser ses analyses, l'essai kinase a dû être réalisé *in vitro* plutôt qu'en gel. La raison principale justifiant ce choix est qu'un transfert de type Western sur membrane de PVDF est nécessaire pour analyser les acides aminés phosphorylés. Les étapes de fixation, de dénaturation et de renaturation des protéines lors de l'essai kinase en gel ne permettent pas de réaliser subséquemment un transfert efficace des protéines.

Comme l'essai kinase est réalisé avant la séparation sur SDS-PAGE, les protéines kinases présentes dans l'essai peuvent utiliser comme substrat la totalité des protéines présentes et non pas seulement les protéines de même taille comme c'est le cas lors des essais kinase en gel.

Le tampon kinase est le même que celui utilisé lors des essais kinase en gel et aucun substrat n'est ajouté. L'essai kinase *in vitro* est mis en route par l'ajout de  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP et est arrêté après une heure. Les produits de réaction sont séparés par SDS-PAGE puis transférés sur membrane de PVDF. La membrane de PVDF est autoradiographiée afin de visualiser les bandes d'activités kinase. Quelques bandes situées à environ 60 kDa ont été choisies parce qu'elles démontraient une forte activité d'autophosphorylation. Ses bandes ont été prélevées afin d'en analyser la composition en acides aminés phosphorylés.

La figure 12 montre les résultats obtenus lors de l'une des analyses. On peut y voir les acides aminés ayant été phosphorylés avec un  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP lors de l'essai kinase *in vitro*. Il est clair que les seuls acides aminés phosphorylés lors de l'essai sont la sérine et la thréonine. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de trois répétitions.



**Figure 12:** Analyse des acides aminés phosphorylés suite à un essai kinase in vitro. Une bande d'intérêt est prélevée sur la membrane de PVDF puis traitée pour une heure à 110°C en présence d'un acide fort (HCL). Les acides aminés libres obtenus ont été séparés par chromatographie en couche mince, parallèlement à des standards (phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosine non radioactivement marqués). Les phosphoamino acides marqués radioactivement lors de l'essai kinase in vitro ont été visualisés par autoradiographie. Les standards ont été visualisés par coloration à la ninhydrine.

### 3.6 Construction d'une banque d'ADNc

Une banque d'ADNc est un outil versatile qui est couramment utilisé pour isoler les clones d'ADNc de protéines induites au niveau d'un organe donné, suivant différents événements tels que: l'exposition à des conditions de stress (blessure, manque d'eau ou de nutriment, froid), le traitement par une hormone ou l'exposition à un pathogène pour n'en nommer que quelques-uns (Mizoguchi, T. et al., 1996; Muschiatti, J., Eyal, Y. et McCormick, S., 1998).

Parallèlement aux essais kinase en gel, une banque d'ADNc a été construite à partir des ovaires de fleurs de *S. chacoense* récoltées 96 heures après une pollinisation compatible. La banque est donc représentative des ARNm présents dans les ovaires, 96 heures après la pollinisation. Une autre banque d'ADNc, construite à partir d'ovaires récoltés 48 heures après la pollinisation, était également disponible. Le tableau II montre les rendements moyens obtenus lors de la purification d'ARNm utilisé pour la construction de la banque 96 heures.

Matériel de départ	Masse	Rendement ( $\mu\text{g}$ d'ARN/g de tissus gelé)
Tissus gelés	1 g	—
ARNtot	525 $\mu\text{g}$	525
ARNm	6 $\mu\text{g}$	6

**Tableau II:** Rendements moyens obtenus lors de la purification d'ARNm.

La banque d'ADNc a été construite dans le vecteur Zap Express de Stratagene. Le choix de ce vecteur s'est fait pour différentes raisons. Notons particulièrement que la présence du promoteur *LacZ* sur le vecteur permet l'expression de protéines dans un système prokaryote. Le titre primaire de la banque était de  $1,55 \times 10^6$  unités formatrices de plage de lyse par ml (pfu/ml). La banque a été amplifiée immédiatement, tel que recommandé par le manufacturier pour stabiliser la banque. Le titre final de la banque après l'amplification est de  $6,4 \times 10^9$  pfu/ml, soit une

amplification de 4129 fois. La taille moyenne des inserts est d'environ 1640 paires de bases, telle que déterminé par l'analyse aléatoire de 20 plages de lyses.

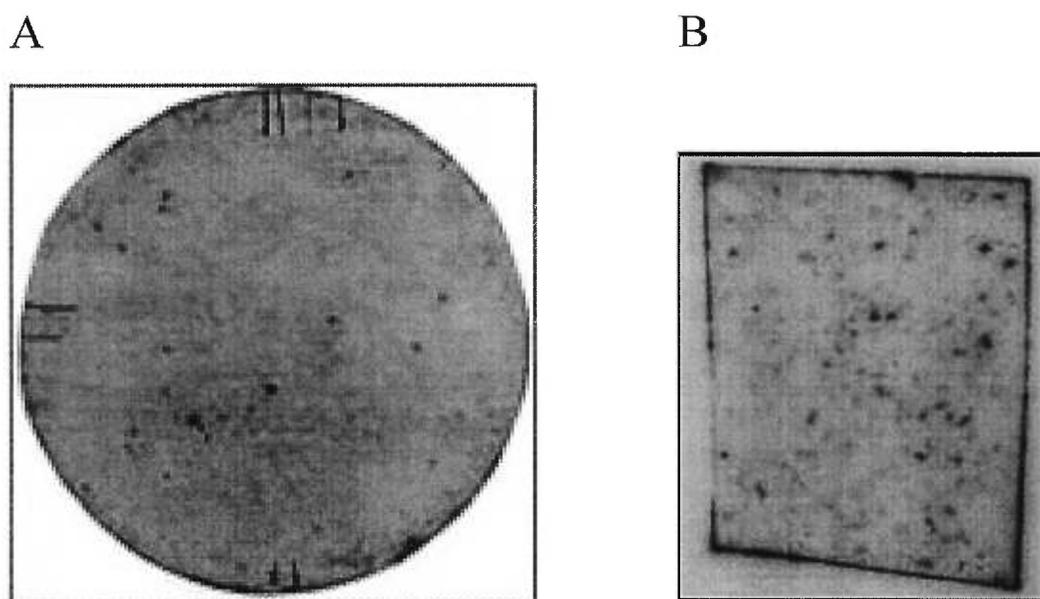
### 3.7 Criblage fonctionnel

Une banque d'ADNc peut être criblée selon différentes méthodes. Le criblage fonctionnel, consiste à cribler le produit d'expression de la banque selon un critère fonctionnel donné (utilisation d'anticorps spécifiques par exemple). Cette technique a été utilisée avec succès à plusieurs reprises lorsque jumelée à une détection par un anticorps anti-phosphotyrosine (Chez les plantes: Ali, N., Halfter, U. et Chua, N.-H., 1994; chez les mammifères: Kornbluth, S., Paulson, K.E. et Hanafusa, H., 1988; Howel, B. et al., 1991; Letwin, K. et al., 1992; et chez la levure: Stern, D.F. et al., 1991). Dans le cas présent, la détection par un anticorps a été remplacée par un test enzymatique. En effet, la possibilité de détecter l'activité enzymatique des protéines kinases, en utilisant le  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP comme donneur de phosphate, a été démontrée dans plusieurs cas. Notons entre autres la méthode de détection sur membrane de PVDF mise au point par Ferrell et Martin (1989 et 1991). Le protocole de criblage fonctionnel décrit à la section 2.2.6 est donc une adaptation des méthodes de criblage fonctionnel avec anticorps et d'essai kinase sur membrane.

Le criblage fonctionnel d'une banque d'ADNc à l'aide d'un essai enzymatique a l'avantage d'avoir un grand pouvoir de discrimination: non seulement on choisit l'organe d'intérêt à un temps donné, mais on cible également un type spécifique d'activité enzymatique. De plus, cette technique permet d'obtenir directement le clone d'ADNc, d'une protéine démontrant de l'activité kinase, sans avoir à passer par des étapes laborieuses de purification de protéines.

Plusieurs essais ont été nécessaires pour mettre au point les conditions optimales d'essai kinase sur membranes. Après avoir obtenu des conditions satisfaisantes (telles que décrites dans la section matériel et méthode),  $8 \times 10^5$  pfu ont été criblées. De ce nombre, une vingtaine de pfu ont semblés démontrer de l'activité kinase lors des criblage primaire et secondaire. Cependant, lors du criblage tertiaire aucune pfu n'a

démontré d'activité kinase. La figure 13 montre un exemple typique de résultats obtenus lors des criblages primaires et secondaires.



**Figure 13:** Exemple de résultats obtenus lors des criblages fonctionnels primaire (A) et secondaire (B).

Les criblages primaires et secondaires ont été faits dans les mêmes conditions sauf pour ce qui est du type de membrane de nitrocellulose utilisé. La Hybond-C Pure de Amersham Life Science était utilisée lors du criblage secondaire alors qu'on utilisait la Protran (BA-85) de Schleider and Schuell lors du criblage primaire. Nous avons remarqué que la Hybond-C Pure rendait les lavages de l'excès de radioactivité beaucoup plus ardues, peu importe le type d'agent bloquant utilisé.

## 4.0 Discussion

---

### 4.1 Choix d'un intervalle de temps suivant la pollinisation

Avant même que la fécondation ait lieu, il y a communication entre les tubes polliniques et le tissu transmetteur du style. Suivant cette interaction, des processus physiologiques spécifiques surviennent, comme l'accroissement du carpelle pour former l'enveloppe du fruit, la formation d'embryons à partir des ovules fécondés, ainsi que la transformation des téguments en enveloppe pour la graine. Ces processus uniques sont contrôlés, au niveau moléculaire, par des voies de transductions de signaux dont l'un des outils universels est l'utilisation des protéines kinases. Chez les plantes, plus d'une dizaine de protéines kinases démontrant un certain niveau d'expression au niveau des organes floraux ont été caractérisées par homologie de séquence (**PMEK**: Decroocq-Ferrant, V. et al., 1995; **atpk-1 et -2**: Zhang, S.H. et al., 1994; **SRK-910**: Goring, D.R. et Rothstein, S.J., 1992; **CCaMK**: Patil, S. et al., 1995; **LePRK-1 et -2**: Muschietti, J. et al., 1998; **PRK-1**: Mu, J.H. et al., 1994; **MsK-1, -2 et -3**: Pay, A. et al., 1993).

Le but visé par le présent travail est d'étudier, par analyse fonctionnelle, les voies de transduction de signaux impliquées au cours des événements hâtifs de reproduction et des premières étapes de développement du fruit chez les plantes. Une attention particulière a été portée aux événements de phosphorylation survenant au niveau du carpelle, dans les quatre jours suivant une pollinisation compatible. Cet intervalle de temps comprend la croissance des tubes polliniques vers l'ovaire, la fécondation et les premières étapes de développement de l'ovaire en fruit. Des études préliminaires, par microscopies à épifluorescence, nous ont permis de confirmer que, sous nos conditions de culture, la majorité des tubes polliniques de *Solanum chacoense* arrivent à l'ovaire environ 36 heures après une pollinisation compatible. Ceci nous a permis d'estimer qu'après 48 heures, la fécondation de la majorité des ovules a eu lieu (Voir résultats de

la figure 5). C'est sur la base de ces résultats qu'a été déterminé l'intervalle de temps (0 à 96 heures) suivant la pollinisation qui a été étudié tout au long de ce projet.

## **4.2 Évaluation de la possibilité de détecter des protéines néosynthétisées au cours de l'intervalle de temps étudié**

À prime abord, lorsque l'on compare visuellement un fruit et le carpelle dont il provient, il est évident que des changements anatomiques importants ont eu lieu. Au cours d'un tel phénomène de développement on observe la participation de plusieurs nouvelles protéines, que ce soit des enzymes ou des protéines structurales. Cependant, toutes ces nouvelles participantes ne sont pas nécessairement néosynthétisées. Plusieurs types de protéines, comme les protéines kinases, sont présentes de façon constitutive sous forme inactive, en attente d'une stimulation (la plupart du temps sous forme de phosphorylation). Il est donc justifié de se demander jusqu'à quel point les phénomènes menant à la formation du fruit impliquent la synthèse de nouvelles protéines au niveau du carpelle. En conséquence, l'une des premières choses à avoir été vérifiée au cours de ce travail est le niveau de détection des protéines néosynthétisées.

Le marquage métabolique des protéines néosynthétisées suivant une pollinisation compatible a été réalisé sur des ovules isolés de *Solanum chacoense*. L'utilisation d'ovules comme matériel de départ offre l'avantage de mesurer l'effet de la fécondation directement sur les cellules principalement touchées par la fécondation. D'autre part, l'isolation des ovules facilite la réalisation du marquage métabolique, qui peut alors être fait simplement en incubant les ovules dans un milieu aqueux contenant de la L-[<sup>35</sup>S]-méthionine.

Les résultats obtenus au terme du marquage métabolique (figure 6) ont permis de tirer plusieurs conclusions. Premièrement, le nombre de protéines néosynthétisées, détectables est très grand: plusieurs dizaines de bandes sont nettement visibles suivant une séparation électrophorétique, et ce de 0 à 96 heures suivant la pollinisation. De

plus, l'intensité d'au moins huit bandes diminue avec le temps suivant la pollinisation alors que l'intensité d'au moins trois bandes augmente au cours du même intervalle de temps. Ces trois dernières bandes sont intéressantes non seulement parce qu'elles deviennent apparentes environ 48 heures suivant la pollinisation, soit juste après que la fécondation ait eu lieu, mais aussi parce qu'elles permettent de confirmer que la diminution observée pour les huit autres bandes n'est pas seulement due à une variation au niveau de la quantité de protéines totales chargées d'un puit à l'autre.

Au terme de cette expérience, les conditions préalables à l'étude des protéines néosynthétisées au niveau du carpelle étaient donc respectées: le niveau de détection obtenu grâce au marquage radioactif est très grand, plusieurs bandes de différents poids moléculaires sont détectables et des variations positives et négatives au niveau de l'intensité de certaines bandes sont observables durant l'intervalle de temps étudié.

### **4.3 Augmentation de la résolution des bandes de protéines par électrophorèse bi-dimensionnelle**

L'ajout d'une séparation de type NEpHGE, qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique, préalablement au SDS-PAGE, augmente nettement la résolution des différents spécimens de protéines analysés. Le niveau de résolution obtenu permet de distinguer clairement une centaine de polypeptides différents pour chacun des intervalles de temps. Ceci équivaut à dire qu'une centaine d'ARNm différents ont pu être traduits en quantité suffisante pour être détecté. Les patrons de traduction des ARNm obtenus pour les échantillons non-pollinisés et pollinisés depuis 48 heures démontrent beaucoup de similitude (voir figure 7). Toutefois, il est nettement observable qu'une modification du patron traductionnel a lieu 96 heures suivant la pollinisation.

Une comparaison entre les patrons bi-dimensionnels des polypeptides solubles extraits de calles et d'embryons somatiques de carottes a déjà été effectuée (Sung, Z.R. et Okimoto, R., 1981). Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'apparition de

deux nouveaux polypeptides lors du développement de l'embryon somatique. À la lumière de ces résultats, nous ne nous attendions pas à observer l'apparition d'un grand nombre de nouveaux polypeptides suivant la fécondation. Pourtant, les résultats que nous avons obtenus démontrent que 96 heures suivant la pollinisation, il est possible d'observer l'augmentation de l'expression d'au moins onze polypeptides.

#### **4.4 Détection d'activité de phosphorylation au niveau des ovaires**

Un essai kinase effectué avec succès sur un gel de deuxième dimension a déjà été rapporté dans la littérature (Sfeir, C. et Veis, A., 1996). Malheureusement, dans notre cas, il n'a pas été possible, malgré de nombreuses tentatives, de détecter de l'activité de phosphorylation en effectuant un essai kinase sur un gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle. Doit-on dès lors conclure qu'aucune protéine kinase n'est présente dans les échantillons analysés? La réponse n'est pas aussi simple. Premièrement, les essais kinases sur gel unidimensionnel réalisés sur les mêmes échantillons, ainsi que l'analyse des acides aminés phosphorylés qui ont été subséquentement effectués, ont clairement démontrés que des protéines kinases sont présentes au niveau des ovaires. Il est possible que la présence d'urée dans le gel de première dimension (NEpHGE) empêche une renaturation efficace des protéines kinases. Comme on le sait, l'urée est un agent dénaturant pour les protéines, c'est d'ailleurs dans ce but que l'urée est utilisé au cours de la première dimension. Une autre hypothèse envisageable est que le point isoélectrique des protéines kinases qui ont pu être détectées par l'essai kinase est situé à l'extérieur du gradient du gel de première dimension.

La technique d'essai kinase en gel permet de visualiser, en parallèle, l'activité de phosphorylation présente au niveau d'une gamme d'échantillons. Les protéines des fractions solubles et membranaires, provenant d'ovaires recueillis 0 à 96 heures suivant la pollinisation, ont ainsi pu être analysées côte à côte. Les résultats obtenus lors des essais kinases en gel unidimensionnel (SDS-PAGE) permettent d'identifier au moins cinq spécimens de protéines (30, 33, 38, 40 et 46 kDa) dont l'activité de

phosphorylation augmente suivant la fécondation (48 heures et plus). Toutes ces protéines ont été extraites dans la fraction soluble. Ceci écarte donc la possibilité qu'il s'agisse de protéines transmembranaires tel les RLK. En se basant uniquement sur la taille des bandes détectées, il pourrait s'agir de MAP kinases, qui ont souvent une taille d'environ 40-45 kDa.

Différents substrats utilisés par une vaste gamme de protéines kinases ont été essayés lors des essais kinases en gel. Les résultats obtenus semblent démontrer que, de façon générale, le substrat préféré soit l'histone H1. La bande de 30 kDa détectée sur le gel contenant le substrat caséine (fraction soluble) est la seule bande dont l'activité est augmentée suivant la fécondation et qui soit détectable avec un seul des substrats. Deux petites protéines kinases ayant un poids moléculaire similaire à cette bande de 30 kDa, ont déjà été identifiées chez la tomate. *Pto*, confère la résistance au pathogène *Pseudomonas syringae* pv. tomato alors que *Fen* rend sensible à l'insecticide fenthion (Martin, G.B. et al., 1993 et Jia, Y., Loh, Y.-T., Zhou, J. et Martin, G.B., 1997). Toutefois, comme cette bande se situe à la limite inférieure de taille pour une kinase, il est également possible qu'elle soit un produit de dégradation ayant conservé son activité de phosphorylation.

#### **4.5 Mise au point de la technique de criblage fonctionnel par essai kinase**

Au cours de la réalisation des différents essais kinases en gel, une nouvelle approche, combinant un essai kinase au criblage d'une banque d'expression, a été mise au point. Une telle technique n'a, à notre connaissance, jamais été décrite dans la littérature. Une technique de criblage fonctionnel, consistant à cribler une banque d'expression avec un anticorps anti-phosphotyrosine, existe déjà et a fait ses preuves chez les plantes (Ali, N., Halfter, U. et Chua, N.-H., 1994). Nous avons toutefois remplacé la détection avec un anticorps par un essai kinase sur membrane de PVDF tel que celui décrit par Ferrell et Martin (1989 et 1991). Cette technique offre l'avantage de

pouvoir isoler directement le clone d'ADNc correspondant à une protéine démontrant l'activité fonctionnelle recherchée.

Jusqu'à présent, les ajustements de base du protocole concernant les temps d'incubations et la réduction de la liaison non spécifique de radioactivité aux membranes ont été mis au point. Des plages positives ont été obtenues lors des criblages primaires et secondaires (voir figure 13). Toutefois, aucun clone n'a pu être retrouvé de façon consistante jusqu'au criblage tertiaire.

Évidemment, cette technique repose sur l'expression de protéines dans un système bactérien. La question de la glycosylation post-traductionnelle risque donc de poser un problème. De plus, il a été démontré que les eukaryotes possèdent un nombre beaucoup plus grand de polypeptides de grande tailles et comportant plus de domaines que les prokaryotes (Netzer, W.J. et Hartl, U., 1997). Au moins deux hypothèses sont avancées pour expliquer cette observation. Premièrement, les eukaryotes possèdent des chaperonnes qui aident au repliement adéquat de certains polypeptides spécifiques en isolant les polypeptides au moment du repliement dans leur cavité centrale (Kubota, H., Hynes, G. et Willison, K., 1995). Deuxièmement, chez les eukaryotes le repliement des différents domaines d'une protéines se fait de façon séquentielle et co-traductionnelle comparativement aux prokaryotes où le repliement est post-traductionnel. Il a été démontré que l'expression de protéines comportant plusieurs domaines dans des bactéries mène souvent à de mauvais repliements entre les domaines et à l'aggrégation des polypeptides (Marston, F.A.O., 1986; Netzer, W.J. et Hartl, U., 1997). Nous ne savons donc pas si l'expression en milieu bactérien permet un repliement adéquat des protéines kinases eukaryotes, qui plus est s'il s'agit de protéines membranaires tel les RLK.

D'autre part, lors du criblage fonctionnel les protéines sont produites à partir de fragments d'ADNc insérés de façon aléatoire dans le vecteur. Il est donc raisonnable de croire qu'une bonne majorité des protéines kinases exprimées le sont sous forme incomplète, augmentant donc encore la difficulté de repliement. Notons que ce genre

de problèmes se pose beaucoup moins lorsqu'une détection à l'aide d'anticorps est utilisée puisque le repliement adéquat d'une simple portion de la protéine recherché suffit souvent à ce qu'elle soit reconnue par un anticorps. Un autre problème occasionné par la détection enzymatique est la nécessité pour l'enzyme d'avoir un substrat disponible. En effet, une protéine kinase pourrait très bien s'être repliée afin d'être complètement fonctionnelle mais demeurer indétectable parce qu'elle est incapable d'autophosphorylation et qu'aucun autre substrat possible n'est présent.

Plusieurs stratégies sont envisageables afin d'améliorer la technique. Entre-autres, il serait possible d'ajouter une période d'incubation dans un extrait de feuilles ou d'ovaires dans le dessein d'aller chercher de possibles co-facteurs ou activateurs permettant d'augmenter l'activité de certaines protéines kinases. Il serait également possible de préalablement saturer les membranes dans une solution contenant un substrat typique des protéines kinases, tel que l'histone, afin de permettre la détection des protéines kinases qui ne s'autophosphorylent pas.

## 5.0 Conclusion

---

Au cours de cette étude, des protéines ont été traduites *in vitro* à partir d'ARNm extraits d'ovaires de *Solanum chacoense* recueillis 0 à 96 heures suivant une pollinisation compatible. Les résultats obtenus lors de l'analyse des produits de traduction *in vitro*, par électrophorèse bi-dimensionnelle, ont permis d'observer que les patrons obtenus avec les échantillons contrôle et recueillis 48 heures suivant la pollinisation sont très similaires. Par contre, 96 heures suivant la pollinisation, une transformation notable du patron d'électrophorèse des protéines néosynthétisées a été observée. Au moins onze nouveaux produits de traduction sont détectables.

Il fut également possible de démontrer que des changements au niveau de l'activité de phosphorylation de plusieurs protéines kinases situées au niveau des ovaires est observable dans les 48 heures suivant la fécondation. Au moins cinq différentes bandes d'activité kinase ont été détectées dans la fraction soluble, à l'aide d'essais kinase en gel (30, 33, 38, 40 et 46 kDa). Il n'est pas encore possible d'émettre des hypothèses sur la fonction de ces protéines. Le poids moléculaire ainsi que la localisation dans la fraction soluble indique qu'il pourrait s'agir de protéines de type MAP kinase. Une purification partielle de ces différents spécimens sera nécessaire pour toutes caractérisations plus approfondies. Suivant purification, des essais enzymatiques *in vitro* à l'aide d'inhibiteurs ou d'activateurs spécifiques pourront être envisagés afin de déterminer avec plus de précision à quelle catégorie de protéines kinases les spécimens détectés appartiennent.

D'autre part, nous avons tenté de mettre au point une technique de criblage d'une banque d'expression utilisant un essai enzymatique (essai kinase) comme méthode de détection. Des plages positives ont été détectées au cours des criblages primaires et secondaires, mais aucune plage positive n'a pu être suivie de façon consistante jusqu'au criblage tertiaire. Dans le futur, il serait intéressant de poursuivre le criblage des banques 48 et 96 heures. Cette technique pourrait représenter un moyen efficace

d'aller directement isoler d'une banque d'ADNc le clone correspondant à une protéine démontrant de l'activité kinase et exprimée au niveau des ovaires suivant la fécondation.

## 6.0 Références

---

**Alderson, A. et al.** (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA **88**, 8602-8605.

**Ali, N., Halfter, U. et Chua, N.-H.** Cloning and biochemical characterization of a plant protein kinase that phosphorylates serine, threonine and tyrosine. J. Biol. Chem. **269**, 31626-31629.

**Anderberg, R.J., Walker-Simmons, M.K.** (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. Proc. Natl Acad. Sci. USA **89**, 10183-10187.

**Anderson, C.W. et al.** (1983) Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. Methods in Enzymol. **101**, 635-644.

**Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K. et Sturgill, T.W.** (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. Nature **343**, 651-653.

**Aviv, H. et Leder, P.** (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. Proc. Natl Acad. Sci. USA **69**, 1408.

**Balch, W.E.** (1990) Small GTP-binding proteins in vesicular transport. Trends Biochem. Sci. **15**, 473-477.

**Banno, H., et al.** (1993) NPK1, a tobacco gene encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11 et *byr2* protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4745-4752.

**Bell, R.M.** (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* **45**, 631-632.

**Bender, J. et Fink, G.R.** (1994) AFC1, a LAMMER kinase from *Arabidopsis thaliana*, activates STE12-dependant processes in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 12105-12109.

**Berridge, M.J. et Irvine, R.F.** (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321.

**Bianchi, M.W., Guivarc'h, D., Thomas, M., Woodgett, J.R., Kreis, M.** (1994) *Arabidopsis* homologs of *shaggy* and GSK-3 protein kinases: molecular cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Mol. & Gen. Genet.* **242**, 337-345.

**Birhman, R.K., Laublin, G. et Cappadocia, M.** (1994) Genetic control of in Vitro shoot regeneration from leaf explants in *Solanum chacoense* Bitt. *Theor. Appl. genet.* **88**, 535-540.

**Bögre, L. et al.** (1996) Mechanosensors in plants. *Nature* **383**, 489-490.

**Bögre, L. et al.** (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* **9**, 75-83.

**Bowler, C. et Chua, N.-H.** (1994) Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* **6**, 1529-1541.

**Bowler, C. et al.** (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73-81.

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

**Braam, J. et Davis, R.W.** (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**, 357-364.

**Braun, D.M. et Walker, J.C.** (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *TIBS* **21**, 70-73.

**Brewbaker, J.L. et Kwack, B.H.** (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* **50**, 859-865.

**Brewster, J.L., Devaloir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. et Gustin, M.C.** (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-1763.

**Carricarte, V.C. et al.** (1988) Adenylate cyclase activity in higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*). *Biochem. J.* **249**, 807-811.

**Chang, C. et al.** (1992) The TMK1 gene from *Arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* **4**, 1263-1271.

**Chang, C. et al.** (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.

**Chaudhury, A.M. et al.** (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 4223-4228.

**Cheung, A.Y., Wang, H. et Wu, H.M.** (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393.

**Clark, S.E. et al.**(1996) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.

**Collinge, M.A. et Walker, J.C.** (1994) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* casein kinase II  $\beta$  subunit by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant mol. Biol.* **25**, 649-658.

**Côté, G.G. et Crain, R.C.** (1993) Biochemistry of phosphoinositides. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 333-356.

**Cresti, M. et al.** (1976) Ultrastructure of transmitting tissue of *Lycopersicon peruvianum* style: development and histochemistry. *Planta* **132**, 305-312.

**Davis, C.G.** (1990) The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol.* **2**, 410-419.

**Decroocq-Ferrant, V., Decroocq, S., Van Went, J., Schimdt, E. et Kreis, M.** (1995) A homologue of the MAP/ERK family of protein kinase genes is expressed in vegetative and female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 339-350.

**Decroocq-Ferrant, V., Van Went, J., Bianchi, M.W., de Vries, S.C. et Kreis, M.** (1995) *Petunia hybrida* homologues of shaggy/zeste-white 3 expressed in female and male reproductive organs. *Plant J.* **7**, 897-911.

**Dobrowolska, G., Boldyreff, B., Issinger, O.G.** (1991) Cloning and sequencing of the casein kinase 2  $\alpha$  subunit from *Zea mays*. *Biochim. Biophys. ACTA* **1129**, 139-140.

- Doerner, P.W.** (1994) Cell cycle regulation in plants. *Plant Physiol.* **106**, 823-827.
- Duclos, B., Marcandier, S. et Cozzone, A.J.** (1991) Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods in Enzymol.* **201**, 10-21.
- Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T., Jacobs, T.** (1993) MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from flowering plant. *Plant Cell* **5**, 87-96.
- Dwyer, K.G. et al.** (1994) A superfamily of S locus-related sequences in *Arabidopsis*: diverse structures and expression patterns. *Plant Cell* **6**, 1829-1843.
- Estruch, J.J., Kadwell, S., Merlin, E. et Crossland, L.** (1994) Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependant calmodulin-independent protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 8837-8841.
- Farley-Grenot, K., Assman, S.M.** (1991) Evidence for G-protein regulation of inward  $K^+$  channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell* **3**, 1037-1044.
- Ferrant, V. , Van Went, J. et Kreis, M.** (1994) Ovule cDNA clones of *petunia hybrida* encoding proteins homologous to MAP an shaggy/zeste-white 3 protein kinases. In: Society for experimental biology seminar series 55: Molecular and cellular aspects of plant reproduction., ed. R.J. Scott & A.D. Stead, Cambridge University Press, 159-172.
- Ferrell, J.E. et Martin, G.S.** (1989) Thrombin stimulates the activities of multiple previously identified protein kinases in platelets. *J. Biol. Chem.* **264**, 20723-20729.
- Ferrell, J.E. et Martin, G.S.** (1991) Assessing activities of blotted protein kinases. *Methods in Enzymol.* **200**, 430-435.

- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. et Meyerowitz, E.M.** Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911.
- Furuya, M.** (1993) Phytochromes: their molecular species, gene families and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.* **44**, 617-645.
- Gehring, C.A. et al.** (1990) Phototropism and geotropism in maize coleotiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* **345**, 528-530.
- Goring, D.R., Rothstein, S.J.** (1992) The S-locus receptor kinase gene in self-incompatibility *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* **4**, 1273-1281.
- Grossniklaus, U. et al.** (1998) Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 446-450.
- Hall, A.** (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**, 635-640.
- Hanks, S.K. et Hunter, T.** (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hardie, D.G.** (1994) Ways of coping with stress. *Nature* **370**, 599-600.
- Harmon, A.C., Yoo, B.-C., McCaffery, C.** (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7278-7287.

**Harper, J.F., Hang, J.-F., Lloyd, S.J.** (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7267-7277.

**Hattori, S. et al.** (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase and its activator by *ras* in intact cells and in cells in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **267**, 20346-20351.

**Hepler, P.K. et Wayne, R.O.** (1985) Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **36**, 397-439.

**Heslop-Harrison, J.** (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *Int. Rev. Cytol.* **107**, 1-77.

**Hirt, H. et al.,** (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding the protein kinase homologous to p34<sup>cdc2</sup>. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 1636-1640.

**Hirt, H.** (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **2**, 11-15.

**Howell, B. et al.** (1991) STY, a tyrosine-phosphorylating enzyme with sequence homology to serine-threonine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 568-572.

**Hülskamp, M., Schneitz, K., Pruitt, R.E.** (1995) Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell* **7**, 57-64.

**Huttly, A. et Phillips, A.L.** (1995) Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* **27**, 1043-1052.

**Jaffe, L.A., Weisenseel, M.H. et Jaffe, L.F.** (1975) Calcium accumulation within the growing tips of pollen tubes. *J. Cell Biol.* **67**, 488-492.

**Jensen, W.A. et Fisher, D.B.** (1969) Cotton embryogenesis: the tissues of the stigma and style and their relation to the pollen tube. *Planta* **84**, 97-121.

**Jia, Y., Loh, Y.-T., Zhou, J. et Martin, G.B.** (1997) Alleles of Pto and Fen occur in bacterial speck-susceptible and fenthion-insensitive tomato cultivars and encode active protein kinases. *Plant Cell* **9**, 61-73.

**Jonak, C., Heberle-Bors, E. et Hirt, H.** (1994) MAP kinases: universal multipurpose signaling tools. *Plant Mol. Biol.* **24**, 407-416.

**Jonak, C., Kiegerl, S., Lloyd, C., Chan, J. et Hirt, H.** (1995) MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol. & Gen. Genet.* **248**, 686-694.

**Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S. et Hirt, H.** (1996) Stress signalling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*

**Kakimoto, T.** (1996) CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.

**Kamps, M.P. et Sefton, B.M.** (1989) Acid and base analysis of phosphoproteins bound to immobilon facilitates analysis of phosphoamino acids in gel-fractionated proteins. *Anal. Biochem.* **176**, 22-27.

**Kieber, J.J. et al.** (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.

**Klimczak, L.J., Collinge, M.A., Farini, D., Guiliano, G. Walker, J.C., Cashmore, A.R.** (1995) Reconstitution of *Arabidopsis* casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* **7**, 105-115.

**Knetsch, M.L.W., Wang, M., Snaar-Jagalska, E. et Heimovaara-Dijkstra, S.** (1996) Abscisic acid induces motigen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* **8**, 1061-1067.

**Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. et Trewavas, A.J.** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**, 524-526.

**Knight, M.R., Smith, S.M. et Trewavas, A.J.** (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 4967-4971.

**Kobe, B., Deisenhofer, J.** (1993) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* **366**, 751-756.

**Kobe, B., Deisenhofer, J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 415-421.

**Kohorn, B.D., Lane, S., Smith, T.A.** (1992) An *Arabidopsis* serine/threonine kinase homologue with an epidermal growth factor repeat selected in yeast for its specificity for a thylakoid membrane protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 10989-10992.

**Konar, R.N. et Linskens, H.F.** (1966a) The morphology and anatomy of the stigma of *Petunia hybrida*. *Planta* **71**, 356-371.

**Konar, R.N. et Linskens, H.F.** (1966b) Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid of *Petunia hybrida*. *Planta* **71**, 372-387.

**Kornbluth, S., Paulsen, K.E. et Hanafusa, H.** (1988) Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5541-5544.

**Kubota, H., Hynes, G. et Willison, K.** (1995) The chaperonin containing t-complex polypeptide I (TCP-I) - Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur. J. Biochem.* **230**, 3-16.

**Kunz, C. et al.** (1996) Phosphorylation of style S-Rnases by Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases from pollen tubes. *Sex Plant Reprod.* **9**, 25-34.

**Kyriakis, J.M. et al.** (1992) Raf-1 activates MAP kinase kinase. *Nature* **358**, 417-421.

**Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.

**Lange-Carter, C.A. et al.** (1993) A divergence in MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* **260**, 315-319.

**Lawton, M.A., Yamamoto, R.T., Hanks, S.K., Lamb, C.J.** (1989) Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 3140-3144.

**Lee, H.-S. et al.** (1996) PRK1, a receptor-like kinase of *Petunia inflata*, is essential for postmeiotic development of pollen. *Plant J.* **9**, 613-624.

**Lee, H.-S. et al.** (1997) Embryo sac development is affected in *Petunia inflata* plants transformed with an antisense gene encoding the extracellular domain of receptor kinase PRK1. *Sex Plant Reprod.* **10**, 341-350.

**Letwin, K. et al.** (1992) A mammalian dual specificity protein kinase, Nek 1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germs cells. *EMBO J.* **11**, 3521-3531.

**Li, H.-Y. et Gray, J.E.** (1997) Pollination-enhanced expression of a receptor-like kinase related gene in tobacco styles. *Plant Mol. Biol.* **33**, 653-665.

**Li, J. et Chory, J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.

**Li, W. et Assman, S.M.** (1993) Characterization of G-protein-regulated outward K<sup>+</sup> channel activity in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 262-266.

**Ligterink, W. et al.** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**, 2054-2057.

**Ling, V. et Zielinski, R.E.** (1989) Cloning of cDNA sequences encoding the calcium-binding protein, calmodulin, from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Physiol.* **90**, 714-719.

**Lusini, P. et al.** (1991) Adenylate cyclase in roots of *Ricinus communis*; stimulation by GTP and Mn<sup>+</sup>. *Phytochemistry* **30**, 109-111.

**Marston, F.A.O.** (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.

**Martin, G.B. et al.** (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**, 1432-1436.

**Martin, G.B. et al.** (1994) A member of the tomato *Pto* gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. *Plant Cell* **6**, 1543-1552.

**Miller, D.D., Callaham, D.A., Gross, D.J. et Hepler, P.K.** (1992) Free  $\text{Ca}^{2+}$  gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J. Cell Sci.* **101**, 7-12.

**Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Kamada, H., Shinozaki, K.** (1993) Cloning and characterization of two cDNAs encoding casein kinase II catalytic subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant mol. Biol.* **21**, 279-289.

**Mizoguchi, T. et al.** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultures cells. *Plant J.* **5**, 111-122.

**Mizoguchi, T. et al.** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 765-769.

**Mu, J.-H., Lee, H.-S. et Kao, T.-H.** (1994) Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell* **6**, 709-721.

**Muranaka, T., Banno, H., Machida, Y.** (1994) Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2958-2965.

**Muschietti, J., Eyal, Y. et McCormick, S.** (1998) Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell* **10**, 319-330.

**Netzer, W.J. et Hartl, U.** (1997) Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343-349.

**Neuhaus, G., Bowler, C., Kern, R., Chua, N.H.** (1993) Calcium/calmodulin-dependant and -independant phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**, 937-952.

**O'Farrell, P.H.**, (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

**O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H.** (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1142.

**Ohad, N. et al.** (1996) A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 5319-5324.

**Olsen, R.A.** (1988) Postpollination placental development of diploid *Solanum tuberosum*. *Can. J. Bot.* **66**, 1813-1817.

**Parkinson, J.S.** (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**, 857-871.

**Paterson, H.F. et al.** (1990) Microinjection of recombinant p21<sup>tho</sup> induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell. Biol.* **111**, 1001-1007.

**Patil, S., Takezawa, D. et Poovaiah, B.W.** (1995) Chimeric plant calcium/calmodulin-dependant protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 4897-4901.

**Pay, A., Jonak, C., Bögre, L., Meskiene, I., Mairinger, T., Szalay, A., Herberle-Bors, E., Hirt, H.** (1993) The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of *shaggy/glycogen synthase kinase-3* and shows differential expression patterns in plant organs and development. *Plant J.* **3**, 847-856.

**Perera, I.Y. et Zielinsky, R.E.** (1992) Structure and expression of the *Arabidopsis* CaM-3 calmodulin gene. *Plant Mol. Biol.* **19**, 649-664.

**Picton, J.M. et Steer, M.W.** (1985) The effects of ruthenium lanthanum, fluorescein isothiocyanate and trifluoperazine on vesicle transport, vesicle fusion, and tip extension in pollen tubes. *Planta* **163**, 20-26

**Pierson, E.S. et al.** (1994) Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* **6**, 1815-1828.

**Polya, G.M. et al.** (1991) Resolution of a higher plant protein kinase similar to the catalytic subunit of cAMP-dependant protein kinase. *Plant Sci.* **79**, 37-45.

**Pöpping, B., Gobbons, T. et Watson, M.D.** (1996) The *Pisum sativum* MAP kinase homologue (PsMAPK) rescues the *Saccharomyces cerevisiae hog1* deletion mutant under conditions of high osmotic stress. *Plant Mol. Biol.* **31**, 355-363.

**Posada, J., Sanghera, J. Pelech, S., Aebersold, R. et Cooper, J.** (1991) Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2517-2528.

**Quail, P.H.** (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 389-409.

**Rathore, K.S., Cork, R.J. et Robinson, K.R.** (1991) A cytoplasmic gradient of  $Ca^{2+}$  is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev. Biol.* **148**, 612-619.

**Raven , P.H., Evert, R.F. Eichhorn, S.E.** (1992) *Biologie of plants*, 5<sup>e</sup>édition, (New York, Worth publishers).

**Roberts, D.M. et Harmon, A.C.** (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.

**Rolland, J.C. et Rolland, F.** (1983) *Atlas de biologie végétale Tome 2*, 3<sup>e</sup>édition, Paris, Masson.

**Romero, L.C., Lam, E.** (1993) Guanine nucleotide binding protein involvement in early steps of phytochrome-regulated gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 1465-1469.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>ième</sup> édition, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)

**Sano, H., Youssefian, S.** (1994) Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 2582-2586

**Schneider, R., Schweiger, M.** (1991) A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic *trk* and *trkB* tyrosine kinase receptors. *Oncogene* **6**, 1807-1811.

**Seo, S. et al.** (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**, 1988-1992.

**Sfeir, C. et Veis, A.** (1996) The membrane associated kinases which phosphorylate bone and dentin extracellular matrix phosphoproteins are isoforms of cytosolic CKII. *Connective Tissue Research* **35**, 215-222.

**Shibata, W. et al.** (1995) A tobacco protein kinase, NPK2 has a domain homologous to a domain found in activators of mitogen-activated protein kinases (MAPKKs). *Mol. & Gen. Genet.* **246**, 401-410.

**Siegelman, M.H. et al.** (1990) The mouse lymph node homing receptor is identical with the lymphocyte cell surface marker Ly22: role of EGF domain in endothelial binding. *Cell* **61**, 611-622.

**Sistrunk, M., Antosiewicz, D.M., Purugganan, M.M. et Braam, J.** (1994) *Arabidopsis* TCH3 encodes a novel Ca<sup>2+</sup> binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell* **6**, 1553-1565.

**Song, W.-Y. et al.** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**, 1804-1806.

**Stafstrom, J.P., Altschuler, M. et Anderson, D.H.** (1993) Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Mol. Biol.* **22**, 83-90.

**Stein, J.C. et al.** (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 8816-8820.

**Stern, D.F., Zheng, P., Beidler, D.R. et Zerillo, C.** (1991) Spk1, a new kinase from *Saccharomyces cerevisiae*, phosphorylates proteins on serine, threonine, and tyrosine. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 987-1001.

**Stone, J.M. et Walker, J.C.** (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* **108**, 451-457.

**Subramaniam, R., Després, C., Brisson, N.** (1997) A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* **9**, 653-664.

**Sung, Z.R. et Okimoto, R.** (1981) Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 3683-3687.

**Terry, N., Van Montagu et Inze, D.** (1993) GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* **22**, 143-152.

**Tobias, C.M., Howlett, B. et Nasrallah, J.B.** (1992) An *Arabidopsis thaliana* gene with sequence similarity to the S-locus receptor kinase of *Brassica oleracea*. *Plant Physiol.* **99**, 284-290.

**Torii, K.U. et al.** (1996) The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**, 735-746.

**Trewavas, A. et Gilroy, S.** (1991) Signal transduction in plant cells. *Trends Genet.* **7**, 356-361.

**Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. et Clark, S.E.** (1999) The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-405.

**Usami, S. et al.** (1995) Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 8660-8664.

**Valon, C. et al.** (1993) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene (TMKL1) encoding a putative transmembrane protein with an unusual kinase-like domain. *Plant Mol. Biol.* **23**, 415-421.

**van der Greer, P., Hunter, T. et Lindberg, R.A.** (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251-337.

**Verma, D.P.S., Cheon, C.-I. et Hong, Z.** (1994) Small GTP-binding proteins and membrane biogenesis in plants. *Plant Physiol.* **106**, 1-6.

**Walker, J.C.** (1993) Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **3**, 451-456.

**Walker, J.C.,** (1994) Structure and function of the receptor-like kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1599-1609.

**Walker, J.C. et Zhang, R.** (1990) Relationship of putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* **345**, 743-746.

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

**Webb, A.A.R. et al.** (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Adv. Bot. Res.* **22**, 45-96.

**Wilhelmi, L.K., Preuss, D.** (1996) Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance. *Science* **274**, 1535-1537.

**Wilhelmi, L.K., Preuss, D.** (1997) Blazing new trails. Pollen tube guidance in flowering plants. *Plant Physiol.* **113**, 307-312.

**Wilson, C., Anglmayer, R., Vicente, O. et Heberle-Bors, E.** (1995) Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli*, and characterization of multiple mitogen-activated protein kinases from tobacco. *Eur. J. Biochem.* **233**, 249-257.

**Wilson, C., Voronin, V., Touraev, O., Vicente, O. et Heberle-Bors, E.** (1997) A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**, 2093-2100.

**Wu, H.M., Wang, H. et Cheung, A.Y.** (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **82**, 395-403.

**Yang, Z.** (1996) Signal transducing proteins in plants: an overview. Dans: D.P.S. Verma (éd.) *Signal transduction in plants growth and development*. Springer-Verlag, Wien, New York, 1-37.

**Yang, Z. et Watson, J.C.** (1993) Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 8732-8736.

**Zhang, S.H. et al.** (1994) atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **269**, 17586-17592.

**Zhang, S. et Klessig, D.F.** (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**, 809-824.

**Zhao, Y. et al.** (1994) Molecular cloning and biochemical characterization of a receptor-like serine-threonine kinase from rice. *Plant Mol. Biol.* **26**, 791-803.

**Zérial, M. et Stenmark, H.** (1993) Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**, 613-620.