

Université de Montréal

L'étude du protéome et du phosphoprotéome durant la fécondation et le début de l'embryogenèse chez *Solanum chacoense* Bitt.

Par Kateryna Vyetrogon
Département de Sciences biologiques
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)

Avril, 2006

@ Kateryna Vyetrogon 2006



QK

3

U54

2006

V. 006



Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'étude du protéome et du phosphoprotéome durant la fécondation et le début de l'embryogenèse chez *Solanum chacoense* Bitt.

Présenté par :

Kateryna Vyetrogon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur: David Morse

Membre du jury : Jean Rivoal

Directeur de recherche : Daniel P. Matton

Mémoire accepté le

Résumé

La fécondation et le début de l'embryogenèse constituent des étapes importantes dans le développement des plantes. Pour identifier des gènes qui jouent un rôle durant cette étape cruciale j'entreprends ici une étude comparative du protéome des ovaires de *Solanum chacoense* à différents temps après la pollinisation. Dix-sept protéines différentes ont été identifiées et leur rôle possible lors de la fécondation et le début de l'embryogenèse est discuté ici. La seconde facette de mon projet porte sur la transduction de signaux lors de la fécondation. La phosphorylation protéique constitue un des types majeurs de modifications post-traductionnelles et est considérée comme un événement clé pour la transmission du signal chez les eucaryotes. Il est donc important d'identifier des phosphoprotéines impliquées dans la fécondation pour mieux comprendre la signalisation durant cet événement important. Pour pouvoir valider la nature phosphorylée des protéines identifiées nous comparons ici trois méthodes différentes de détection de phosphoprotéines. Les résultats de cette comparaison entre le marquage *in vivo*, l'immunodétection et la coloration avec un colorant spécifique aux phosphoprotéines sont présentés et discutés.

Les mots clés : fécondation, embryogenèse, pollinisation, phosphorylation, protéome, phosphoprotéome, phosphoprotéines.

Abstract

One of the most important developmental processes in plants is exemplified by the formation of the seed which starts from the double fertilization process. To identify genes that are important for this process we conducted a comparative proteome analysis for proteins expressed at different times after pollination in the model plant *Solanum chacoense*. Seventeen different proteins were identified and their putative roles during fertilization are discussed. Another major aspect of my project is to better understand signal transduction events that occur during fertilization. Protein phosphorylation constitutes one of the most prominent types of post-translational modifications in the cell and is considered to be a key event for signal transduction in eukaryotes. To be able to understand the signaling processes during fertilization we must identify the phosphoproteins involved in this process. To validate the phosphorylation status of the proteins we identified in this study we compared different phosphoprotein detection methods: in vivo labeling, immunodetection, and staining with a specific fluorophore. The results of this comparison are discussed.

Key words : fertilization, pollination, embryogenesis, phosphorylation, proteome, phosphoproteome, phosphoproteins.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et des abréviations françaises.....	x
List of English abbreviations.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1 La reproduction chez les plantes supérieures.....	2
1.1.1 La structure de la fleur.....	2
1.1.2 La formation des gamètes mâles.....	4
1.1.3 La formation des gamètes femelles.....	5
1.1.4 La fécondation.....	7
1.1.5 L'embryogenèse.....	9
1.2 La protéomique.....	9
1.2.1 La protéomique et la nouvelle biologie.....	9
1.2.2 Le protéome et le génome.....	11
1.2.3 La protéomique et les études de la formation de la graine chez les plantes.....	11
1.2.4 La phosphorylation protéique.....	12
1.3 Le projet.....	13
2 L'article.....	15
2.1 Introduction.....	17
2.2 Materials and Methods.....	19
2.2.1 Plant material and sampling procedure.....	19
2.2.2 In vivo labeling of the ovaries.....	19
2.2.3 Protein extraction.....	21
2.2.4 Second dimension electrophoresis.....	21
2.2.5 Gel staining.....	22
2.2.6 Western blotting and immunodetection.....	23
2.2.7 Image analysis.....	24
2.2.8 Protein identification by LC-MS/MS.....	24
2.2.9 RNA extraction, probe preparation, cDNA array hybridization and data analysis.....	25
2.3 Results and Discussion.....	26
2.3.1 Comparison of phosphoprotein detection methods.....	26
2.3.2 In vivo ³² P labeling.....	27
2.3.3 Antibody detection.....	29
2.3.4 Phosphospecific protein dye.....	33
2.3.5 Comparison of the three phosphoprotein detection methods.....	35
2.3.6 Analysis of proteins differentially expressed during fertilization.....	42

2.3.7	LC-MS/MS identification of the selected proteins	46
2.3.8	Proteome and transcriptome comparison.....	54
2.4	Concluding remarks	55
2.5	Acknowledgements.....	56
2.6	References.....	57
3	Discussion.....	60
3.1	La comparaison des différentes méthodes de détection des phosphoprotéines.	60
3.2	Analyse de protéines exprimées de manière différentielle durant la fécondation.....	63
3.3	Identification des protéines et des phosphoprotéines ayant démontrées une variation dans leur abondance ou leur phosphorylation	64
4	Conclusion	70
5	References.....	71
6	Remerciements.....	79

Liste des tableaux

Table 1. Comparison of different phosphoprotein detection methods.....39

Table 2. List of proteins that present a reproducible change in staining with Pro-Q

Diamond or Sypro Ruby identified by LC-MS/MS.....47

Liste des figures

Figures de l'introduction du memoire :

Figure 1: La structure de la fleur.....3

Figure 2: Schéma illustrant la formation du gamétophyte femelle et mâle.....6

Figure 3: Schéma illustrant la double fécondation chez les végétaux.....8

Figures de l'article

Figure 1 : Schematic drawing of the method method used to radioactively label ovary proteins with ^{32}P in vivo.20

Figure 2 : Comparison of the 2-DE patterns obtained from ^{32}P -labelling and Sypro Ruby (total protein) staining.28

Figure 3 : Comparison of the 2-DE patterns obtained with anti-phospho-Ser, anti-phospho-Thr, and anti-phospho-Tyr antibody detection.31

Figure 4: 2-DE patterns obtained with the Pro-Q Diamond phospho-specific stain before and after alkaline phosphatase treatment.34

Figure 5 : Compilation map of the phosphoproteins detected with the three different detection methods.37

Figure 6 : Venn diagram analysis of numbers of phosphoproteins detected with the three different detection methods used and matched on the Sypro Ruby gel.....41

Figure 7 : Time-course analysis of protein expression during fertilization as demonstrated by 2-DE.43

Figure 8 : Time-course expression profiles of the proteins that were retained for MS/MS identification.44

Liste des sigles et des abréviations françaises

%	pourcentage
°C	degré Celcius
µg	microgramme
ng	nanogramme
µL	microlitre
µM	micromolaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ATP	Adenosine-Tri-Phosphate
électrophorèse 2D	électrophorèse bidimensionnelle
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
GTP	Guanosine-Tri-Phosphate
HAP	heures après la pollinisation
LC-MS/MS	chromatographie liquide suivie de spectrométrie de masse en tandem
Ser	serine
Thr	threonine
Tyr	tyrosine

List of English abbreviations

2-DE	bi-dimensional electrophoresis
2-D electrophoresis	bi-dimensional electrophoresis
α -NAC	putative nascent polypeptide associated complex alpha chain
Arm	Armadillo
ATP	Adenosine-Tri-Phosphate
capLC	capillary liquid chromatography
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DTT	dithiothreitol
DNA	deoxyribonucleic acid
EST	Expressed sequence tag
GTP	Guanosine-Tri-Phosphate
h	hour
HAP	hours after pollination
HPLC	high performance/pressure liquid chromatography
HSP	heat shock protein
IEF	isoelectric focusing
IPG	immobilized pH gradient
LC-MS/MS	liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry
MAF1	MFP1 attachment factor 1
MFP1	Matrix attachment region binding Filament like Protein
PRK	protein receptor kinases
PVDF	poly(vinylidene difluoride)

Ran	Ras-related nuclear small GTP-binding protein
RanBP1	Ran binding protein-1
RNA	ribonucleic acid
mRNA	ribonucleic acid messenger
ROS	reactive oxygen species
Rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serine
TCA	trichloroacetic acid
TFA	trifluoroacetic acid
Thr	threonine
Tyr	tyrosine
U/ μ l	units per microliter
V	volt
V•h	volt per hour
v/v	volume per volume

1. Introduction

Le cerveau humain est souvent attiré par les mystères de l'immensément grand et de l'immensément petit. Dans la biologie moléculaire, nous sommes dans l'univers de l'immensément petit. Ici on découvre tout un monde vivant et complexe à l'intérieur de chaque cellule, composé d'une multitude de molécules interagissant ensemble. Parmi ces molécules, il y a les acides nucléiques surtout reconnus comme responsables de la sauvegarde et de la transmission du code génétique, ainsi que les protéines codées par cette information et qui sont impliquées dans toutes les étapes du fonctionnement de la cellule. Les protéines sont une classe de molécules complexe et riche en mystères, dont on cherche à comprendre la structure, le fonctionnement, de même que l'immense réseau de leurs interactions. Essayer d'établir la relation entre l'immensément petit et le grand, entre les mondes des cellules et les différentes étapes de la vie d'un organisme qu'elles composent est particulièrement fascinant. La grande question toujours si passionnante : « Comment toutes ces cellules qui vivent chacune pour elles composent en même temps des organismes capables d'autant de choses?! ». Les organismes auxquels je m'intéresse dans cette étude sont les plantes, ces organismes qui ont permis l'évolution de la vie sur notre planète comme on la connaît aujourd'hui, qui nous permettent de respirer, manger et vivre. La question qui m'intéresse est de comprendre comment une étape cruciale de leur vie, la reproduction sexuée, est reflétée au niveau cellulaire. Plus particulièrement, mon intérêt se portera sur les événements de transduction de signaux impliquant la phosphorylation des protéines régulées par la fécondation chez les angiospermes. Ces plantes ont perfectionné une structure de reproduction spécialisée et unique, la fleur. La fleur est responsable de la production de gamètes mâles et femelles, et elle est aussi le siège de l'union des deux gamètes durant la fécondation et où la graine va se développer. Regardons ce processus plus en détail.

1.1 La reproduction chez les plantes supérieures

1.1.1 La structure de la fleur

On caractérise généralement comme une fleur la structure d'une tige raccourcie, avec quatre rangs ou verticilles de feuilles modifiées constituant les parties stériles et fertiles de la fleur. Les parties stériles du premier et second verticille sont les sépales et les pétales, respectivement (Figure 1). Les sépales, la plupart du temps vertes, protègent le reste de la fleur en l'entourant jusqu'à son ouverture. Les pétales, souvent colorés, ont pour fonction d'attirer les insectes et d'autres pollinisateurs comme les oiseaux. À l'intérieur de ces deux rangs sont situés les organes fertiles, responsables directement de la reproduction sexuée chez les angiospermes. Le premier rang fertile, le troisième verticille, est constitué des étamines qui représentent les unités mâles. Les étamines sont composées d'un filament qui porte à son extrémité distale quatre sporanges tenues ensemble dans une structure nommée anthère. Le deuxième rang fertile, le quatrième verticille, est celui au centre de la fleur, et il est constitué des carpelles (ou pistil composé de un ou plusieurs carpelles) représentant les unités femelles. Les parties principales des carpelles sont la partie basale élargie connue sous le nom d'ovaire et contenant les ovules; et à l'autre bout, la surface réceptive, connue sous le nom de stigmate. Ces deux parties sont souvent séparées par une partie robuste connue sous le nom de style. Ces quatre rangs de la fleur produits par le méristème floral sont déterminés de manière précise sous l'action de facteurs de transcription encodés par de multiples gènes homéotiques regroupés dans le modèle classique ABC (Bowman et al., 1991; Coen and Meyerowitz, 1991) et récemment modifié pour accommoder deux nouvelles classes de gènes homéotiques correspondants aux classes E et D (Pelaz et al., 2000; Theissen and Saedler, 2001; Ferrario et al., 2004).

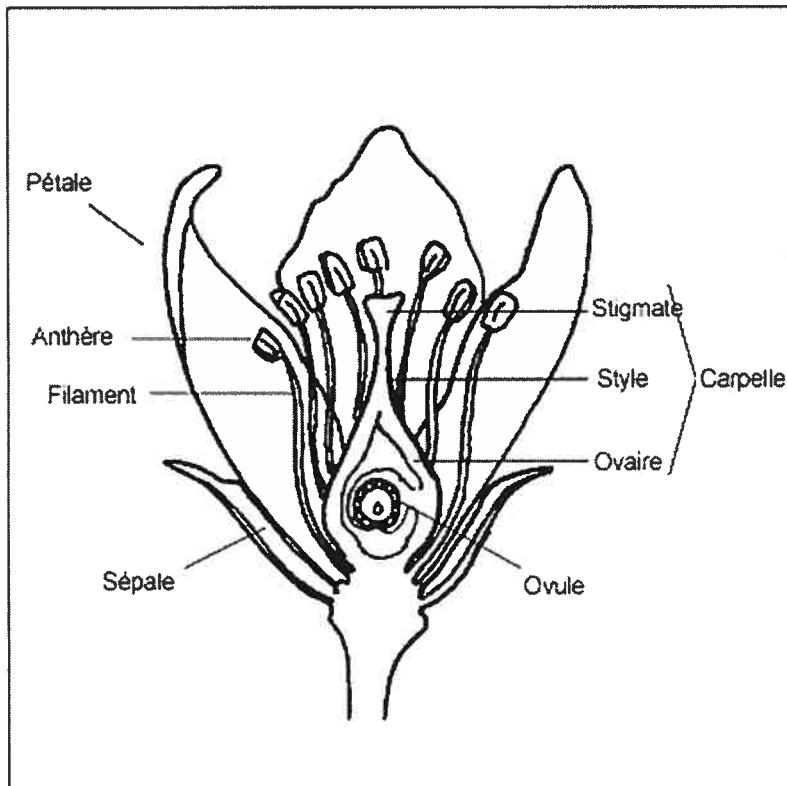


Figure 1: La structure de la fleur.

Cette image a été adaptée de http://www.partnersinair.org/fr/curriculum_unit3_bkgd.html

1.1.2 La formation des gamètes mâles

La formation des gamètes mâles débute dans les boutons floraux très jeunes, où à l'intérieur des futures anthères une colonne de microsporocytes est formée. La division méiotique de ces microsporocytes diploïdes produit des microspores haploïdes (typiquement quatre par microsporocyte) qui se différencient en grains de pollen (Bedinger, 1992). Les microspores développent une paroi cellulaire complexe, absorbent des nutriments et se différencient. Le développement du pollen est supporté par le tapetum de l'anthère car son ablation interrompt la maturation du pollen (Mariani, 1990). Chaque cellule haploïde se divise asymétriquement en une grande cellule végétative et une plus petite cellule générative, les deux enfermées à l'intérieur de la paroi du grain de pollen (Southworth, 2001). La cellule générative se divise, soit dans le grain de pollen, soit dans le tube pollinique pour donner naissance à deux gamètes mâles, les deux cellules spermatiques. Le grain de pollen mature enfermant les deux cellules spermatiques constitue le gamétophyte mâle. La figure 2 illustre la formation des gamètes mâles.

1.1.3 La formation des gamètes femelles

Pendant que le gamétophyte mâle se forme, un processus parallèle mène à la formation du gamétophyte femelle dans les ovules. Chaque ovule contient une masse de cellules non différenciées, appelée nucelle. La division d'une cellule du nucelle forme le mégasporocyte qui va ensuite entreprendre la méiose pour former quatre mégaspores haploïdes. Dans la majorité des espèces angiospermes (70%) trois des quatre mégaspores formées vont dégénérer. La mégaspore survivante croîtra pour donner le sac embryonnaire (Russel, 2001). Ce type de formation du sac embryonnaire est connu sous le nom de monosporique (Maheshwari, 1950; Davis, 1966). Dans le 30% restant des angiospermes, plusieurs mégaspores contribuent à la formation du mégagamétophyte (Davis, 1966). Le sac embryonnaire formé va ensuite subir des divisions mitotiques successives, suivies par la formation d'une paroi. Le sac embryonnaire mature contient six cellules haploïdes : l'œuf, deux synergides, trois cellules antipodales. Il contient aussi deux noyaux libres qui vont fusionner pour donner un noyau polaire diploïde à l'intérieur de la partie restante du sac embryonnaire connue sous le nom de cellule centrale (Raghavan, 1997). Ce sac embryonnaire mature contenant sept cellules représente le gamétophyte femelle. La formation des gamètes femelles est illustrée par la figure 2.

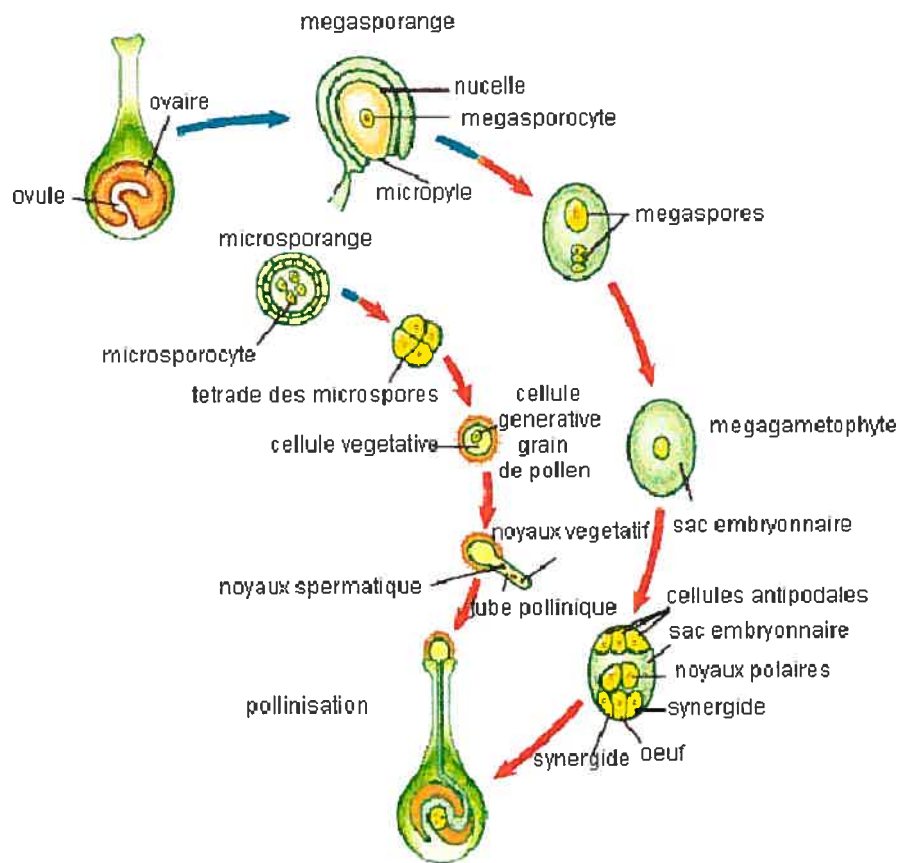


Figure 2: Schéma illustrant la formation du gamétophyte femelle et mâle.

Les flèches bleues représentent les stades diploïdes; les flèches rouges représentent les stades haploïdes.

Cette image a été adaptée de

<http://chsweb.l.r.k12.nj.us/mstanley/outlines/plantae/angiosperms/angiosperms.htm>

1.1.4 La fécondation

La fécondation définit la phase de l'union de ces deux gamètes dont on vient de décrire la formation, donnant lieu à la formation d'un zygote. La fécondation de l'œuf est précédée par le transfert des grains de pollen des anthères à la surface stigmatique et par la germination subséquente des grains de pollen. Pendant la germination, le grain de pollen développe un tube qui pousse à travers les tissus du style et de l'ovaire pour arriver à l'entrée des ovules, au niveau du micropyle, pour enfin atteindre le sac embryonnaire (Figure 3). Chez *S. chacoense*, comme pour plusieurs plantes sauvages, la réalisation de cette étape est seulement possible si le grain de pollen réussit à passer au travers des barrières d'incompatibilité, forts importantes pour promouvoir et sauvegarder la diversité génétique (De Nettancourt, 1997). Seul le grain de pollen avec un bagage génétique différent du gamétophyte femelle va réussir à atteindre le sac embryonnaire. A l'arrivée au sac embryonnaire le tube pollinique doit passer à travers les synergides pour arriver à la cellule œuf. Il existe, dépendamment des espèces, deux manières par lesquelles le tube pollinique franchit les synergides. Dans la première, le tube pollinique perce les synergides de manière mécanique (van Went, 1984; Willemse, 1984; Russel, 1992; Higashiyama et al., 2000), alors que dans la seconde, les synergides entreprennent un processus de mort cellulaire programmée juste avant l'arrivée du tube pollinique (Jensen, 1983; Huang, 1992; Christensen, 1997; Christensen, 2002). Cette deuxième manière implique l'existence des molécules de signalisation pour annoncer l'arrivée du tube pollinique. Pour le moment, seule l'existence de molécules de signalisation exprimées par les synergides et guidant le tube pollinique a été démontrée (Higashiyama et al., 1998; Higashiyama et al., 2001; Higashiyama, 2002; Higashiyama et al., 2003). Une fois le tube pollinique arrivé dans le sac embryonnaire, les cellules spermatiques sont déchargées du tube dans le sac. Une des cellules spermatiques fusionne avec la cellule œuf pendant que la deuxième fusionne avec le noyau polaire de la cellule centrale. Ce processus, appelé double fécondation, produit le zygote diploïde et le noyau triploïde de l'albumen primaire (Nawaschin, 1898, 1900).

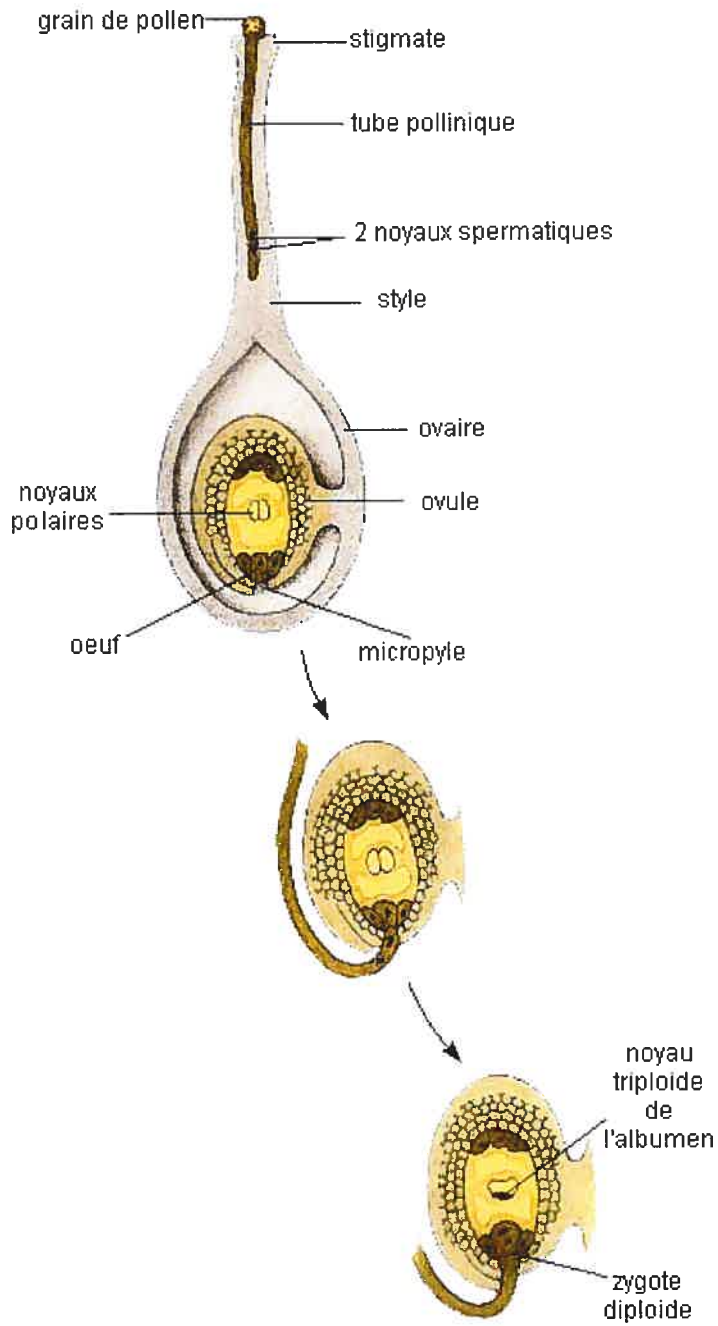


Figure 3: Schéma illustrant la double fécondation chez les végétaux

Cette image a été adaptée de <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2003/2fert.jpg>

1.1.5 L'embryogenèse

La fusion des noyaux est suivie par une période de repos, ou plutôt de réorganisation qui peut être d'une durée variable (Wardlaw, 1955). Ensuite le noyau de l'albumen primaire et le zygote commencent leurs divisions, l'albumen un peu avant le zygote. Le zygote est la première cellule de la génération sporophytique. Elle entreprend une période d'activité mitotique élevée pour se développer en embryon. Le noyau de l'albumen primaire va se différencier en tissu nutritif connu sous le nom d'albumen. L'embryon entreprend des changements importants en formant des organes comme la racine, l'hypocotyle, les cotylédons et la tige. Au niveau cellulaire, l'embryon et l'albumen commencent à accumuler de grandes quantités de nutriments comme des hydrates de carbone ou glucides, des protéines de réserve et des lipides. L'ovule renfermant l'embryon et l'albumen se transforme en graine. L'ovaire autour de l'ovule se transforme en fruit protégeant la graine et aidant à sa dispersion.

1.2 La protéomique

1.2.1 La protéomique et la nouvelle biologie

La protéomique est l'étude du protéome qui est le complément de protéines encodées par le génome. Les termes « protéomique » et « protéome » ont été proposés par Wilkins et ses collègues au début des années 1990 pour les superposer aux termes « génomique » et « génome », qui décrivent la collection entière des gènes d'un organisme (Wilkins, 1996). Cette terminologie « omique » symbolise la redéfinition de notre manière de penser la biologie, où l'on n'étudie plus les gènes et les protéines individuellement ou des petits groupes de composantes reliées des voies biochimiques spécifiques, mais plutôt des ensembles de systèmes. Chaque cellule a des milliers ou des dizaines de milliers de gènes qui peuvent être exprimés dans des combinaisons différentes. Chaque protéine a une fonction qui a de l'importance seulement dans le contexte de toutes les autres fonctions et activités exprimées dans la même cellule. C'est

pourquoi les biologistes d'aujourd'hui s'efforcent de penser large, pour comprendre les systèmes plutôt qu'uniquement les composantes et de démêler toute cette complexité.

L'ensemble de l'expression de gènes peut être suivi par la technique des biopuces « *microarray* » d'ADN. Cette technique consiste à mettre des séries d'oligonucléotides spécifiques aux gènes ou des séquences des banques d'ADNc sur une lame de verre ou une petite puce. En y appliquant un mélange d'ARNm marqués de manière fluorescente on peut suivre l'expression de milliers de gènes en même temps. Malheureusement, il a été montré que les niveaux des ARNm ne prédisent pas nécessairement les niveaux des protéines correspondantes dans la cellule (Anderson and Seilhamer, 1997; Anderson and Anderson, 1998; Gygi et al., 1999; Ideker et al., 2001). Les différences de stabilité des ARNm et d'efficacité de leur traduction peuvent affecter la génération de nouvelles protéines. Une fois formées, les protéines n'ont pas toutes la même stabilité ou les mêmes taux de dégradation. Beaucoup de protéines impliquées dans la transmission de signaux, dans la régulation des facteurs de transcription et dans le contrôle du cycle de la cellule subissent rapidement un arrêt de fonction ou une dégradation pour réguler leur activité. De plus, les niveaux d'ARNm ne disent rien sur le statut de régulation des protéines correspondantes, l'activité et la fonction desquelles sont sujettes à des nombreuses modifications post-traductionnelles endogènes ainsi que d'autres modifications par les agents environnementaux. D'où le besoin d'étudier l'ensemble des protéines elles-mêmes pour suivre leur expression.

La protéomique est l'étude des systèmes multiprotéiques dans laquelle l'emphase est mise sur l'interaction de plusieurs protéines différentes faisant partie d'un plus grand système. Le concept de protéomique est la biologie des systèmes plutôt que la biologie structurale. En d'autres mots, le but de la protéomique est de caractériser le comportement du système plutôt que le comportement des composantes uniques de ce système (Liebler, 2002).

1.2.2 Le protéome et le génome

Chacune des cellules contient toute l'information nécessaire pour former un organisme complet. Cependant ce ne sont pas tous les gènes qui sont exprimés dans toutes les cellules. Les gènes qui codent pour des enzymes essentielles pour le fonctionnement de base de la cellule sont exprimés dans toutes les cellules alors que d'autres avec des fonctions très spécialisées sont exprimés seulement dans des types cellulaires spécifiques. Donc chaque organisme a un seul génome mais beaucoup de protéomes différents. Le protéome dans une cellule représente donc une sous-catégorie de tous les produits génétiques possibles. Cependant, cela ne veut pas dire que le protéome est plus simple que le génome. Dans la réalité, c'est l'opposé. N'importe quelle protéine, tout en étant le produit d'un seul gène, peut exister sous des formes multiples qui varient dépendamment du type cellulaire ainsi que des nombreuses modifications qu'elle peut subir. Ces modifications affectent la structure de la protéine, sa localisation, sa fonction, et sa durée de vie.

1.2.3 La protéomique et les études de la formation de la graine chez les plantes

Comme nous venons de voir, la protéomique offre une opportunité intéressante d'examiner des changements simultanés en abondance des protéines pendant des processus développementaux complexes (Bove et al., 2002). Un des plus importants processus développemental chez les plantes est la formation de la graine qui, comme nous l'avons vu, commence avec la double fécondation pour mener à la formation d'un embryon double qui va donner naissance ensuite à la structure qu'on appelle la graine. Un certain nombre d'études protéomiques ont ciblé ce processus. Une importance particulière a été donnée à des plantes produisant des graines d'importance économique, étudiant le remplissage de la graine chez l'avoine, le soya, *Medicago* (Finnie et al., 2002); (Hajduch et al., 2005) (Gallardo et al., 2003), la formation de l'albumen chez le blé (Vensel et al., 2005), ou la germination chez l'avoine (Ostergaard et al., 2004). La germination des graines de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a aussi été étudiée (Gallardo et al., 2002). Cependant, ces études se sont concentrées sur des événements prenant place après la formation de l'embryon et, à notre connaissance, aucune étude protéomique n'a encore

été conduite sur les étapes prenant place au tout début de la formation de la graine, correspondant à la période juste avant la formation de l'embryon et de la graine, soit la fécondation. Une des grandes difficultés dans l'étude de la fécondation est qu'elle a lieu dans la cellule œuf, l'oocyte, caché dans l'ovule, qui lui-même n'est qu'une partie minuscule de l'ovaire. A ce jour, il a été donc très difficile d'isoler et de travailler sur des protéines spécifiques de l'oocyte. Une étude a cependant réussi en utilisant des cellules isolées à caractériser des protéines abondantes dans des oocytes non-fécondés (Okamoto et al., 2004).

1.2.4 La phosphorylation protéique

Les modifications post-traductionnelles des protéines permettent une grande plasticité à la machinerie cellulaire nécessaire pour la régulation des fonctions cellulaires. Parmi les différents types de modifications, la phosphorylation protéique occupe une place prépondérante, mobilisant un grand nombre de gènes, surtout chez les plantes (Laugesen et al., 2004). Il est maintenant reconnu que la phosphorylation réversible est une composante essentielle de presque toutes les voies de signalisation dans une cellule vivante. Les changements de l'état de phosphorylation d'une protéine se font par deux activités enzymatiques distinctes: celle des protéines kinases qui catalysent l'attachement covalent d'un groupe phosphate à un acide aminé ; et celle des protéines phosphatases qui renversent ce processus (Luan, 2000). Il a été estimé que le génome humain encode à peu près 500 protéines kinases et 100 protéines phosphatases, ce qui représente 2% de son génome, alors que celui d'*Arabidopsis* encode 1100 protéines kinases et entre 100 et 200 protéines phosphatases, représentant 5% de son génome (Initiative, 2000; Zolnierowicz and Bollen, 2000; Venter et al., 2001; Kerk et al., 2002). La phosphorylation protéique chez les plantes régule non seulement les voies universelles mais aussi des processus uniques comme la photosynthèse et la photomorphogénèse (Allen, 1992). La caractérisation des kinases impliquées dans la reconnaissance pollen/stigmate (Walker and Zhang, 1990; Walker, 1993), dans le développement floral (Roe et al., 1993), ainsi que la caractérisation récente d'un groupe de kinases impliquées

dans la fécondation et l'embryogenèse (Germain et al., 2005) démontre le rôle crucial que la phosphorylation joue dans la reproduction sexuée des plantes.

1.3 Le projet

Le projet de recherche que j'ai réalisé durant ma maîtrise portait sur l'identification de protéines importantes lors de la fécondation et au début de l'embryogenèse chez les plantes supérieures, ainsi que sur la signalisation cellulaire qui a lieu durant cette période. Pour la réalisation de ce projet j'ai utilisé la méthode de l'électrophorèse bidimensionnelle qui est une technique basée sur le principe de la séparation de protéines totales selon leur point isoélectrique et leur poids, permettant d'étudier directement les profils d'expressions de plusieurs centaines de protéines simultanément.

La première étape de mon projet portait sur l'étude comparative de trois méthodes différentes de détection des phosphoprotéines : le marquage *in vivo*, l'immunodétection et la coloration avec un colorant fluorescent spécifique aux phosphoprotéines, le ProQ Diamond Stain.

Pour la deuxième étape j'ai utilisé ces techniques pour comparer les protéomes et les phosphoprotéomes des ovaires à des stades différents lors de la fécondation et le début de l'embryogenèse. Le séquençage par LC-MS-MS m'a permis d'identifier des protéines intéressantes et d'élaborer sur leurs possibles rôles durant cette période importante du développement végétal. Comme modèle d'étude j'ai choisi la plante *Solanum chacoense*, un excellent système pour l'étude de la fécondation et de l'embryogenèse grâce à son système d'auto-incompatibilité permettant de contrôler précisément le temps de la fécondation. De plus, cette plante possède de nombreuses fleurs d'assez grandes tailles permettant une collecte facile des ovaires. Sa parenté étroite avec d'autres solanacées d'importance économique comme la tomate (*Solanum lycopersicum*) et la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) a aussi permis l'utilisation de banques de données d'EST (*Expressed sequence tag*) considérables pour la détermination de l'identité des protéines séquencées.

Ce projet a mené à la rédaction d'un article scientifique dont je suis le premier auteur. Le projet a été réalisé sous la direction du Professeur Daniel P. Matton. L'article sera soumis au journal Proteomics.

2 L'article

A comparative proteome and phosphoproteome analysis of differentially regulated proteins during fertilization in the self-incompatible species *Solanum chacoense* Bitt.

Kateryna Vyetrogon and Daniel P. Matton*.

Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV). Département de sciences biologiques, Université de Montréal, 4101 Sherbrooke Est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

*Author for correspondence:

Tel: 1-514-872-3967

Fax: 1-514-872-9406



Abstract

We have used two-dimensional gel electrophoresis for a time-course study of the changes in proteins and phosphoproteins that occur immediately after fertilization in *Solanum chacoense* Bitt. The phosphorylation status of all the detected proteins was determined with three different methods: in vivo labeling, immunodetection, and phosphoprotein specific staining. Using a pI range from 4 to 7, 262 phosphorylated proteins could be mapped to the 619 proteins detected by Sypro Ruby staining, representing 42% of the total proteins. Among these 262 phosphoproteins, antibodies detected 184 proteins from which 78 were also detected with either of other two methods (42%). Pro-Q Diamond phosphoprotein stain detected 111 proteins from which 76 were also detected with either of the other two methods (68%). The ^{32}P in vivo labeling method detected 90 spots from which 78 were also detected with either of other two methods (87%). When comparing before and after fertilization profiles, 38 proteins and phosphoproteins presented a reproducible change in their accumulation profiles. Of these, 24 spots were selected and analyzed by LC-ESI-Q/TOF-MS/MS. Peptide data were searched against publicly available protein and EST databases. The putative roles of some of the identified proteins in early fertilization events are discussed.

Keywords: Fertilization / Embryogenesis / *Solanum chacoense* / Proteome / Phosphoproteome / Two-dimensional gel electrophoresis / Protein identification / Mass spectrometry.

Abbreviations: HAP, hours after pollination.

2.1 Introduction

Over the last decade numerous DNA sequencing projects have harvested a large amount of genomic and expressed sequence data. Although several high-throughput RNA expression measurement tools have been developed, with microarray analysis being at the forefront of global gene expression, these powerful techniques only look at the transcriptional regulation of a set of genes. One of the biggest hurdle in relating modulations observed at the gene expression level and their actual effects at the protein level is the fact that mRNA levels are not always a consistent indication of a protein's abundance, and several studies have already revealed poor correlations between changes in the abundance of specific mRNAs and their corresponding proteins [1-4]. This is probably due in part to large differences in mRNA and protein stability and turnover. In addition, many proteins undergo extensive post-translational modifications that can significantly affect their activity and subcellular localization. Therefore, only the study of the proteins themselves provides information on their real amount and/or activity at a given time in a given tissue, or in response to a given stimulus or treatment [5]. Proteomic analyses also offer the opportunity to examine simultaneous changes in protein accumulation occurring in complex developmental processes, and to determine informative temporal expression patterns [6]. One of the most important developmental processes in plants is exemplified by the formation of the seed. Seed formation starts from the double fertilization process that takes place in the embryo sac of the ovule where the two male gametes delivered by the pollen tube fertilize the two female gametes, the haploid egg cell and the diploid central cell. This event then leads to the development of the diploid embryo from the egg cell, that will eventually give rise to the new sporophytic generation, and of the triploid endosperm from the central cell, an ephemeral tissue primarily involved in the nutrition of the developing embryo [7]. Although a number of proteomic studies have targeted later events during seed development, including germination [8-14], to our knowledge no proteomic or phosphoproteomic studies have yet focused on the very early stages of seed development corresponding to the period directly preceding embryo and eventually seed formation, namely the fertilization event itself. One major hurdle comes from the fact that the egg

and the central cell are encased in the embryo sac, a small part only of the entire ovule, that itself is only a small part of the whole ovary. One promising approach involves the use of isolated cells, but low sensitivity due to the difficulty of harvesting the cells combined with invasive isolation methods makes this approach tedious and time-consuming, although it has been successfully used to isolate abundant proteins from the egg cell prior to fertilization [15].

Protein phosphorylation constitutes one of the most prominent type of post-translational modification in the cell and it mobilizes a large number of genes, especially in plants, where it largely participates to the complexity of the proteome [16]. It is estimated that in humans one third of all proteins are simultaneously phosphorylated at any given time, mobilizing two percent of the genes (approximately 500 protein kinases and 100 protein phosphatases) [17, 18]. In plants, these proportions are even higher. In *Arabidopsis* there are approximately 1100 protein kinases and between 100 and 200 protein phosphatases, which constitutes 5% of its genome [19, 20]. Classically, detection of phosphoproteins within a protein mixture relied on the combination of electrophoretic procedures to isolate proteins and either autoradiography (in the case of prior cell labeling with ^{32}P) or immunodetection using antibodies raised against phosphorylated residues [16]. Recently, an alternative approach of direct staining of gels with a phosphoprotein specific fluorophore (Pro-Q Diamond dye) was proposed [21-23].

We have recently shown through an EST sequencing project from fertilized ovules and from the fine expression analysis of the isolated plant protein receptor kinases (PRK), that most of the PRKs were modulated at the transcriptional level following pollination or fertilization [24]. In the present study, and using a similar approach, the ovary proteome and phosphoproteome during ovule fertilization will be investigated in the self-incompatible species *Solanum chacoense*, a close relative of the potato and tomato. Three phosphoprotein detection methods to identify phosphoproteins differentially regulated during fertilization have been compared and the biological relevance of the isolated proteins will be discussed.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Plant material and sampling procedure

All plant material was collected from *S. chacoense* Bitt. genotype G4 (self-incompatibility alleles S₁₂S₁₄). For fertilization-related events, *S. chacoense* genotype V22 (self-incompatibility alleles S₁₁S₁₃) was used as the pollen donor. These genotypes were obtained from crosses between line PI 458314 (self-incompatibility alleles S₁₁S₁₂) and line PI 230582 (self-incompatibility alleles S₁₃S₁₄) originally obtained from the Potato Introduction Station (Sturgeon Bay, WI). In order to collect all plant material on the same day for processing and analyses, flowers were pollinated on two consecutive days: the 42 h and 48 h after pollination samples on the first day, and the 30 h and 36 h after pollination samples on the second day. For each sample 30 flowers were pollinated and these experiments were done in triplicate (biological triplicates) to avoid differences due to growth conditions. Flowers were hand-dissected immediately after collection and the ovaries were kept at -80°C until protein extraction.

2.2.2 In vivo labeling of the ovaries

For in vivo labeling, flowers were hand pollinated in the greenhouse and six hours before ovary collection time, inflorescence stems bearing approximately 8-10 flowers were placed in a microtube containing 0.4 mCi of a ³²P-orthophosphate solution diluted in 40 µl of water (H₃PO₄, Perkin Elmer, Boston, MA) for 20 min until total absorption (see Figure 1). Immediately following the absorption, the inflorescence stems were placed in sterile water for 6 h. Absorption of ³²P-orthophosphate by different tissues was monitored by scintillation counting over time and after 6 h, when the ³²P labeling had reached the flowers, flowers were then collected dissected. Ovaries were isolated and frozen at -80°C until analysis.

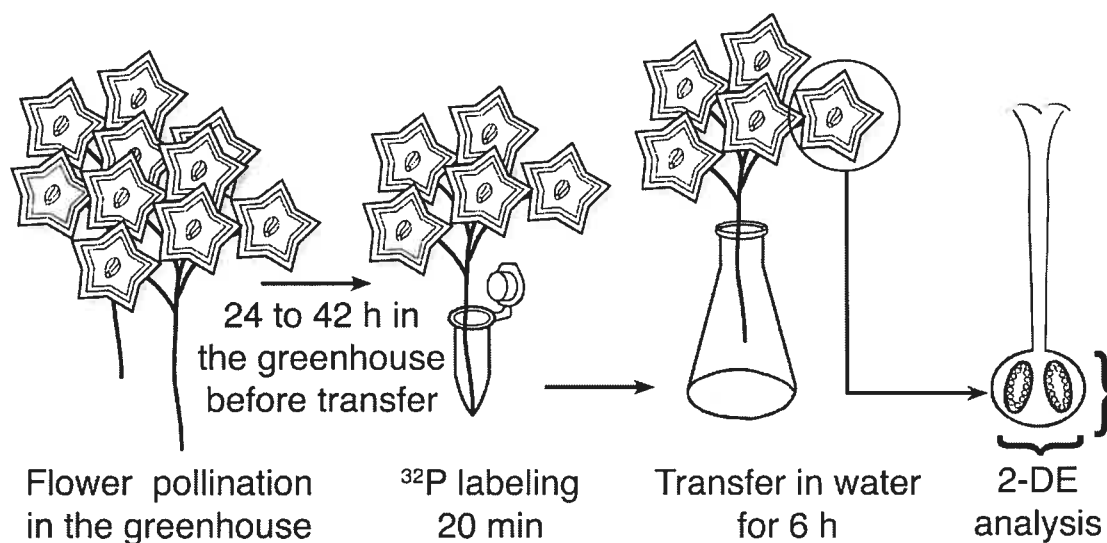


Figure 1: Schematic drawing of the method method used to radioactively label ovary proteins with ^{32}P in vivo. After manual pollination, inflorescence stems bearing 8-10 flowers were cut and placed in a microtube containing ^{32}P orthophosphate until total absorption. Immediately following absorption, the inflorescence stems were placed in sterile water for 6 h. Absorption of ^{32}P -orthophosphate was monitored by scintillation counting over time and 6 h was determined as optimal to get sufficient ^{32}P labeling in the ovary. Flowers were then collected and dissected. Ovaries were isolated and prepared for 2-D gel analyses.

2.2.3 Protein extraction

Fresh or frozen ovaries were ground in a mortar in the presence of liquid nitrogen. One hundred mg corresponding to 60 ovaries were resuspended in 1 mL of ice-cold 10% TCA/acetone, 0.07% β -mercapthoethanol and allowed to precipitate overnight at -20°C . Following precipitation, the samples were centrifuged at 13000 g in a microtube centrifuge at 4°C and the precipitate was washed twice with 1 mL of cold 80% acetone and 0.07% β -mercapthoethanol. The samples were then dried by vacuum centrifugation for 1-2 min and resuspended in 300 μL of IEF sample buffer (8 M Urea, 50 mM dithiothreitol (DTT), 4% (w/v) CHAPS, 0.2% (v/v) Carrier ampholytes pH 3-10, 0.0002% (w/v) Bromophenol Blue) for 1 hour with vigorous vortexing. Insoluble material was removed by centrifugation at 13000 g in a table centrifuge for 30 min.

The protein content of the supernatant was quantified using the Bio-Rad assay (Hercules, CA) based upon a modified procedure of Bradford [25] using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Sixty micrograms of extracted proteins were used for gels stained with Pro-Q Diamond, while 100 μg of proteins were used for in vivo ^{32}P orthophosphate labeling and 250 μg of proteins were used for antibody detection or Coomassie staining.

2.2.4 Second dimension electrophoresis

Proteins were resuspended in 125 μL of sample and IEF buffer with 1 nM of calyculin A phosphatase inhibitor (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and used to rehydrate IPG strips (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For the dephosphorylation assay, calyculin A was omitted and 10 μL (1 U/ μL) of alkaline phosphatase (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) were added to the sample one hour prior to rehydration. Rehydration was performed overnight at room temperature with strips covered with mineral oil. Following rehydration, the strips were blotted against absorbing paper to remove excess liquid and mineral oil, placed in the IEF tray containing the wet wicks on the electrodes, covered with new mineral oil, and focused in the Protean® IEF focusing chamber (Bio-Rad). The protocol used for focusing included three steps: 1) 15 min at 250 V with rapid

slope setting; 2) 2 h at 8000 V with rapid slope setting; 3) 8000 V until 20,000 Vh is reached.

Following IEF, IPG strips were frozen at -20°C until the next day. After thawing (10 min), the IPG strips were removed from the focusing tray, blotted to remove excess oil and incubated for 10 min in SDS equilibration buffer (6 M Urea, 2% (w/v) SDS, 0.05 M Tris/HCl pH 8.8, 20% (v/v) Glycerol) with 2% (w/v) DTT, followed with another 10 min incubation in SDS equilibration buffer containing 2.5% (w/v) iodoacetamide. The IPG strips were then rinsed with SDS running buffer (25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS) and placed on 10% acrylamide gels. Strips were overlaid with 0.5% (w/v) agarose in SDS running buffer with a trace of Bromophenol Blue. Second-dimension SDS-PAGE was performed in the Mini-PROTEAN® Dodeca cell (Bio-Rad) at 200V for 45 min and at 4°C or until the Bromophenol blue dye started migrating off the gel. Following migration the gels were either subjected to western blotting or stained with a specific protein stain.

2.2.5 Gel staining

For Pro-Q Diamond Phosphoprotein staining, the gels were fixed overnight in the Pro-Q Diamond Fix solution (50% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) at room temperature with gentle agitation. On the next day, the gels were incubated in fresh Pro-Q Diamond Fix solution for 30 min. The gels were then washed three times 10 min with water and stained with the Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain for 47 min. Longer staining periods increased the total number of proteins detected but significantly decreased the specificity of the phosphoprotein dye. The gels were then immediately destained in the destaining solution (20% (v/v) 1,2-propanediol, 50 mM sodium acetate, pH 4.0) for 1 h followed by a second destain step for 1 h. The gels were then rinsed with water and scanned with a Typhoon 9200 phosphorimager (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) using 532 nm excitation and the 610 BP 30 emission filter. Following the scan, the gels were then stained with Sypro Ruby (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) overnight at room temperature with gentle agitation. The gels were then washed with

10% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid for 30 min at room temperature with gentle agitation. The gels were finally rinsed with ultrapure distilled water and scanned using 582 nm excitation and the 610 BP 30 emission filter.

Gels that contained ^{32}P labeled proteins were stained with Sypro Ruby only, dried for 3 h in a GelAir Dryer (Bio-Rad), and scanned using 582 nm excitation and the 610 BP 30 emission filter with a Typhoon 9200 phosphorimager for total protein pattern. The dried gels were then exposed with one intensifying screen on Kodak Biomax MR film (Interscience, Markham, ON, Canada) for 2 weeks at room temperature.

For Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining, the gels were stained overnight with 0.25% (w/v) CBB G-250, 10% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid and then washed several times for 30 min with 10% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid until complete background destaining.

2.2.6 Western blotting and immunodetection

After two-dimensional electrophoresis, the proteins were transferred electrophoretically onto PVDF membranes in 25 mM Tris base, 192 mM glycine and 20% (v/v) methanol. After transfer, the membranes were stained with Ponceau Red and then scanned with a digital scanner (AGFA Duoscan T1200, Toronto, ON, Canada). The membranes were then washed with 25 ml TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) and blocked for 1 h with 25 ml of blocking buffer (TBS with 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) BSA) at room temperature with gentle agitation. Following blocking, the membranes were washed three times for 5 min each with 15 ml of TBS wash buffer (TBS with 0.1% (v/v) Tween-20) and then incubated with the primary antibody (a mix of monoclonal antibodies from either the Phosphoserine, Phosphothreonine, or Phosphotyrosine Detection Kits (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) diluted in blocking buffer at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ overnight at 4°C with gentle agitation. Following the incubation, the membranes were washed three times for 5 min each with 15 ml of TBS wash buffer and then incubated with the secondary antibody (fluorescein conjugated goat anti-mouse total IgG, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) diluted in blocking buffer at a

concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 1 h at room temperature with gentle agitation. Following the incubation, the membranes were washed again three times for 5 min each with 15 ml of TBS wash buffer and then scanned using Typhoon 9200 phosphorimager using 532 nm excitation and the 526 SP emission filter.

2.2.7 Image analysis

Image analysis of the gels stained with Pro-Q Diamond and Sypro Ruby was carried out with the Image Master 2D Elite software (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). Spots were detected with a peak dilation method. The parameters used were: background intensity 13, step size 14, smoothing size 12, minimum width-to-height ration 0.2 and maximum width-to-height ration 10. Other parameters managed by the software were used at their default settings. Some manual corrections were performed in order to ensure the same spots were detected between different gels. For background subtraction, the non-spot method was used. For normalization, the total volume multiplied by total area method was used.

Image analysis of membranes subjected to immunoblotting and gels after autoradiography was carried using Adobe Photoshop version 7.0. Different colors were applied to the total protein staining and to the phosphoprotein staining using Selective Color Tool, and different images of the same gel were then superposed using the Opacity Tool.

2.2.8 Protein identification by LC-MS/MS

Spots that were chosen for sequencing were manually excised with a 1 mL pipet tip either from 7 Sypro Ruby stained gels or from 3 Coomassie stained gels and placed in a 96-well microtiter plate (Sigma, Milwaukee, WI, USA). The proteins were then automatically de-stained, reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide, and digested with porcine trypsin (sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) using a MassPREP protein digest station (Micromass, Manchester, UK). The digest was evaporated to dryness, then dissolved in 12 μL of 0.1% aqueous TFA, of which 6 μL were

analyzed by LC-MS/MS using a capLC ternary HPLC system (Waters, Milford, MA, USA) interfaced to a Q-ToF Ultima Global hybrid tandem mass spectrometer fitted with a Z-spray nanoelectrospray ion source (Micromass, Manchester, UK). Solvents B and C comprised 0.2% formic acid in water, while solvent A consisted of 0.2% formic acid in acetonitrile. The peptide digest sample was loaded onto a C18 trapping column (Symmetry 300, 0.35 x 5 mm Opti-pak; Waters) and washed for 3 min using solvent C at a flow rate of 30 μ L/min. The flow path was then switched using a 10-port rotary valve, and the sample eluted onto a C18 analytical column (PepMap, 75 μ m x 15 cm, 3- μ m particle size; LC Packings). Separations were performed using a linear gradient of 0:100 to 60:40 % A:B over 43 min. The composition was then changed to 80:20 % A:B and held for 10 min to flush the column before re-equilibrating for 7 min at 0:100 % A:B. Mass calibration of the Q-ToF instrument was performed using a product ion spectrum of Glu-fibrinopeptide B acquired over the m/z range 50 to 1900. LC-MS/MS analysis was carried out using data dependent acquisition, during which peptide precursor ions were detected by scanning from m/z 400 to 1900 in TOF MS mode. Multiply charged (2+, 3+, or 4+) ions rising above predetermined threshold intensity were automatically selected for TOF MS/MS analysis, and product ion spectra acquired over the m/z range 50 to 900. LC-MS/MS data were processed using ProteinLynx v2.15 software (Micromass) and searched against the NCBI non-redundant (nr) and EST-others database using MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA). Searches were performed using carbamidomethylation of cysteine as the fixed modification and oxidation of methionine as the variable modification, allowing for one missed cleavage during trypsin digestion.

2.2.9 RNA extraction, probe preparation, cDNA array hybridization and data analysis

DNA microarrays were printed on UltraGAPSTTM Slides (Corning) from 7741 expressed sequence tags (ESTs) corresponding to 6374 unigenes derived from a fertilized ovary cDNA libraries covering embryo development from zygote to late torpedo stages in *Solanum chacoense* [24]. This microarray was used to analyze gene expression profiles in

ovaries 0 and 48 HAP. Total RNA was extracted from unfertilized ovules (0 HAP) and from ovules 48 HAP using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA yield and purity were assessed by absorbance determination at both 260 nm and 280 nm. RNA was only used when the ratio Abs260 nm/Abs280 nm was higher than 1.7. RNA integrity was determined with the RNA 6000 Nano Assay Kit and the Agilent 2100 Bioanalyzer. Thirty (30) µg of total RNA from 48 HAP ovaries were hybridized to microarrays along with the same amount of control RNA (0 HAP ovaries) for 16h at 42°C. The experiment was done with four biological replicates that included two dye swaps. Labeling was performed with a cyanine 3-dCTP or cyanine 5-dCTP (1 mM; NEN Life Science, Boston MA, cat. no. NEL576 and 577). Hybridization and washing were performed as described in the CyScribe Post labeling Kit (Amersham Biosciences) in the CMTTM hybridization chamber (Corning). The DNA microarray slides were scanned with a ScanArray Lite scanner (Perkin Elmer-Cetus, Wellesley, CA; version 2.0) at 10-µm resolution. The resulting 16-bit TIFF files were quantified with QuantArray software (Perkin Elmer-Cetus; versions 2.0 and 3.0). Normalization was performed with Lowess (Locally weighted scatter plot smoothing). Statistical analysis and visualization were performed with GeneSpring software (Silicon Genetics, Redwood City, CA) using the available statistical tools (Student's t test of replicate samples showing a variation different from 1).

2.3 Results and Discussion

2.3.1 Comparison of phosphoprotein detection methods

The present study aimed at the identification of proteins and phosphoproteins differentially regulated during fertilization in plants. For this purpose, we have chosen a wild-relative of the potato, *Solanum chacoense*, that is an obligate outcrosser due to the presence of a genetically determined reproductive barrier active in the style. The presence of this reproductive barrier, termed gametophytic self-incompatibility, involves rejection of pollen when both pistil and pollen share the same allele at the S locus, thus preventing the pollen tube to reach the ovules and to effect fertilization [26]. This self-recognition

and rejection system assures that only genetically different pollen can fertilize the flower, thus making selfing impossible. This, combined with manual pollinations, enables the synchronization of pollination, and thus, of fertilization over a limited time window.

Since the characterization of phosphoproteins still remains a difficult task [16] and no perfect method for their detection exists, three different detection methods were used and compared in order to ascertain the validity of the phosphoproteins detected. These included: 1) autoradiography after *in vivo* labeling with ^{32}P orthophosphate; 2) immunodetection using antibodies raised against phosphorylated residues; 3) direct gel staining with a fluorophore specific for phosphoproteins. Since fertilization takes place from 36 h after pollination (HAP) in *S. chacoense*, and since pollination is known to induce some changes at a distance in the ovary before pollen tubes reach the ovaries [24, 27], 30 HAP ovaries were taken as controls and compared to 36, 42, and 48 h post-pollination ovaries, where fertilization had taken place.

2.3.2 *In vivo* ^{32}P labeling

A 6 h period was determined as optimal to obtain high level of radioactive labeling in the ovaries, and the analysis of proteins differentially phosphorylated after fertilization was carried out in two steps. Firstly, flowers were hand pollinated in the greenhouse and after 24, 30, 36 or 42 h, inflorescence stems were cut and brought into a specially designed growth chamber to enable a safe *in vivo* labeling procedure (Figure 1). Proteins were then isotopically labeled by feeding the cut inflorescence stems bearing 8-10 flowers with a small volume of ^{32}P orthophosphate solution in a microtube for 20 min. The inflorescence stems were then placed in a conical flask containing water and left for 6 h. The proteins were extracted from the labeled ovaries and subjected to 2-D electrophoresis. A total of 147 protein spots were detected on the autoradiogram, of which 90 protein spots (Figure 2, right panel) could also be identified on the Sypro Ruby stained gel (Figure 2, left panel). Numerous spots were also organized in the horizontal lines, suggesting different levels of phosphorylation of the same protein (Figure 2, middle panel). Some of the phosphorylated proteins were present in such low amounts that they were under the detection threshold of the Sypro Ruby total protein stain (Figure 2).

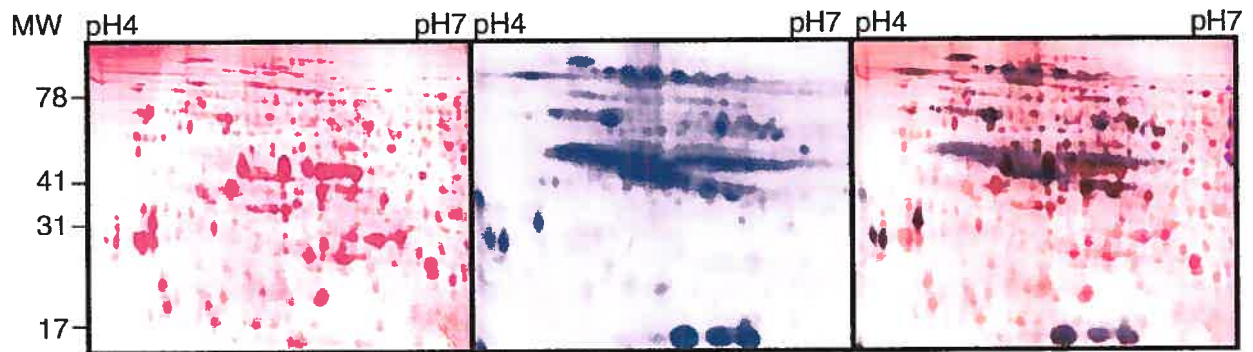


Figure 2: Comparison of the 2-DE patterns obtained from ^{32}P -labelling and Sypro Ruby (total protein) staining. 100 μg of proteins extracted from ^{32}P in vivo-labeled ovaries harvested 48 HAP were separated on IEF strips pH4-7 as first dimension and 10% acrylamide SDS gels as second dimension. The gel was then stained with Sypro Ruby (left panel, proteins colored in pink), then exposed to an autoradiography film and scanned (middle panel, proteins colored in blue). The superposition of the two images showing which protein correspond to a phosphoprotein can be seen in the right panel (dual color).

2.3.3 Antibody detection

For antibody detection, flowers were hand pollinated in the greenhouse and ovaries collected after 30, 36, 42 or 48 HAP. After 2-D electrophoresis and electro-transfer of the protein on PVDF membranes, a different mix of monoclonal antibodies was used to detect phosphoserine (Figure 3A, middle panel), phosphothreonine (Figure 3B, middle panel), and phosphotyrosine (Figure 3C, middle panel) residues. Before antibody detection, Ponceau Red staining was used to visualize the total protein pattern (Figure 3, left panels). Merging of the two images in different colors enabled subsequent mapping of the proteins detected with the various antibodies (Figure 3, right panels). A total of 155 spots could be detected with anti-phosphoserine antibodies, while 284 spots were detected with anti-phosphothreonine antibodies, and 222 spots were detected with anti-phosphotyrosine antibodies (Table 1). Image analysis and overlapping of the patterns obtained with the different antibodies allowed identification of proteins that were simultaneously phosphorylated on different amino acids. All possible phosphorylation patterns were obtained with some proteins being phosphorylated on serine and threonine residues, serine and tyrosine residues, threonine and tyrosine residues and some showing serine, threonine, and tyrosine phosphorylation (for example spots #17, 26, 54 in Figure 5). Although a greater number of protein spots had been identified by each individual antibody, only the ones that could be unambiguously assigned to a Ponceau Red stained protein were considered for the Venn diagram analysis shown in Figure 3D. Figure 5 presents the complete compilation map of the phosphoprotein detection methods identified on a Sypro Ruby stained gel. Interestingly, even though putative phosphoisomers of some proteins can be observed on the membranes from for all three antibodies, the anti-phosphotyrosine detection presented the most obvious phosphoisomer patterns with horizontal lines showing multiple phosphorylation states of the same protein for almost all proteins phosphorylated on tyrosine residues. Considering that each horizontal line of spots detected with anti-tyrosine antibodies may be the same protein, the 222 identified spots would correspond to approximately 50 different proteins. This number is consistent with the fact that no tyrosine kinase similar to mammalian tyrosine

kinases have been isolated in plants although some plant protein kinases have been shown to have dual kinase specificity, phosphorylating both Ser/Thr and Tyr residues [28, 29]. Furthermore, the characterization of a group of about 20 protein tyrosine phosphatases in *Arabidopsis* suggests a wider role of tyrosine phosphorylation in plants [30].

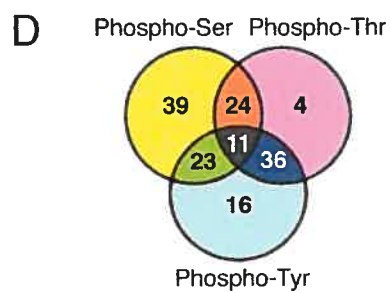
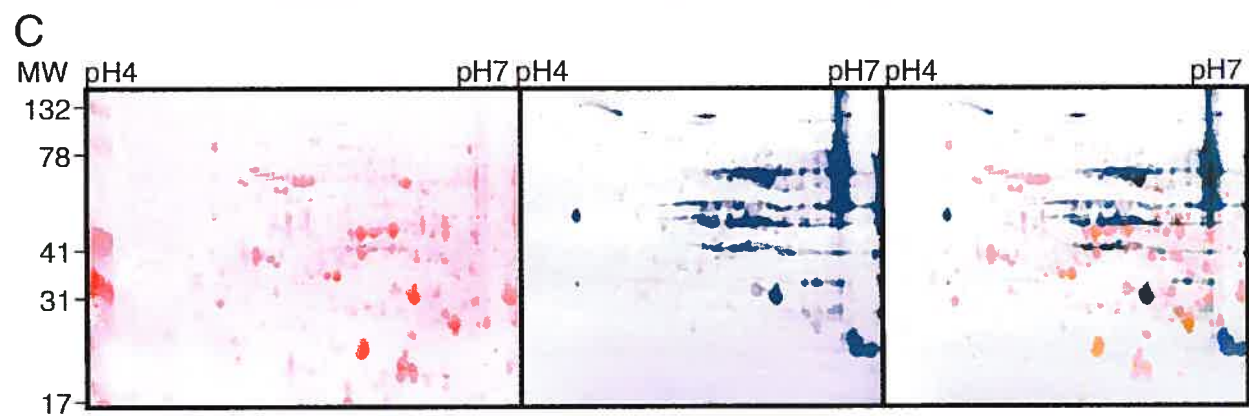
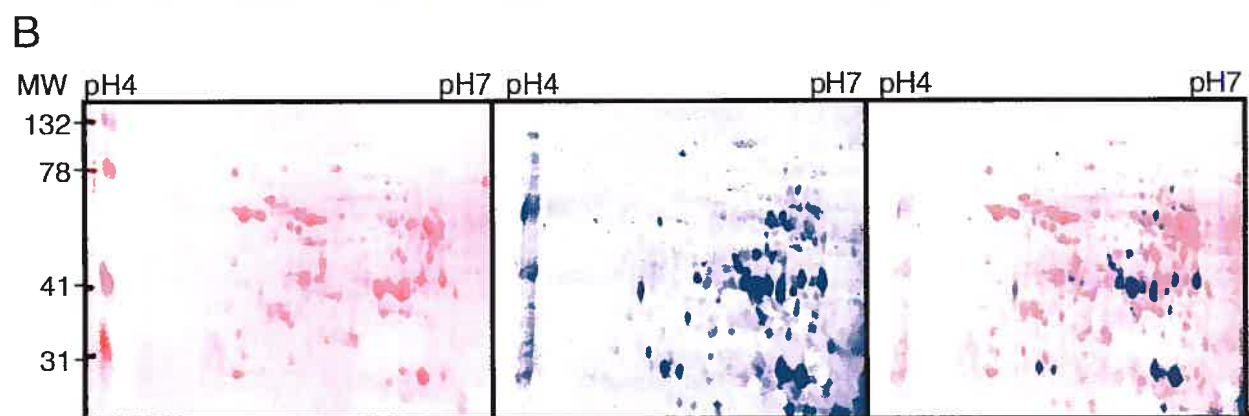
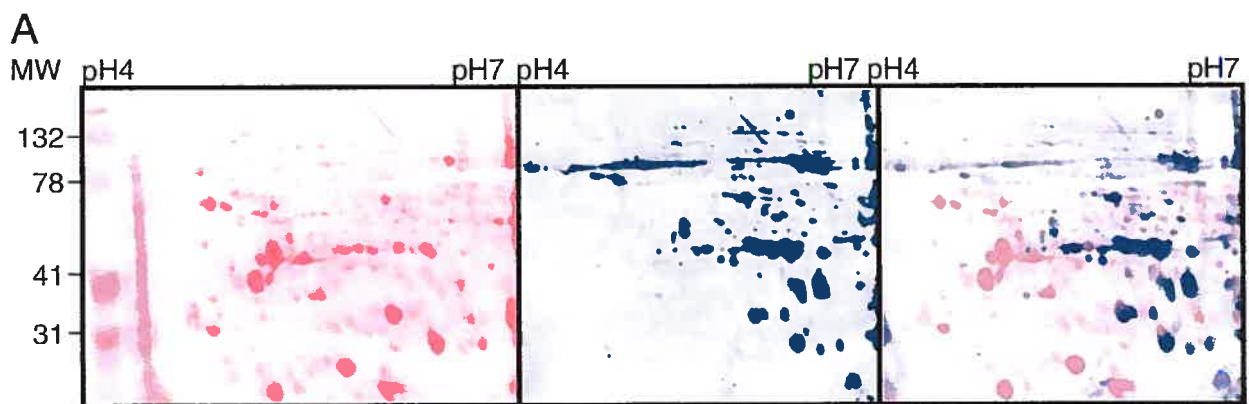


Figure 3: Comparison of the 2-DE patterns obtained with anti-phospho-Ser, anti-phospho-Thr, and anti-phospho-Tyr antibody detection. Left panels. Total protein (colored in pink) extracted from ovaries 0 h post-pollination with Ponceau Red staining of the membranes. Middle panels. Detection of the phosphorylated proteins (colored in blue) with anti-phospho-Ser (A), anti-phospho-Thr (B) and anti-phospho-Tyr (C) antibodies. Right panels. Superposition (dual color) of the Ponceau Red stained membranes and the scans obtained from the fluorescein-conjugated secondary antibody. D. Venn diagram analysis of numbers of phosphoproteins detected with different antibodies and matched on the Sypro Ruby gel showing the overlap between the different antibodies.

2.3.4 Phosphospecific protein dye

For phosphospecific protein dye detection, flowers were hand pollinated in the greenhouse and ovaries collected after 30, 36, 42 or 48 HAP. After 2-D electrophoresis, the gels were stained with the phosphospecific protein dye Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain. Duration of the staining step had to be optimized and 47 minutes was chosen as the optimal time. With staining times longer than 47 minutes, the patterns obtained were very similar to those obtained from the total protein stain (Sypro Ruby), which suggests that a long staining period leads to a loss of staining specificity. Furthermore, even with this optimized staining time, more putative phosphoprotein spots were observed with Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain than with either of other two methods. This, combined with the fact that general protein staining increases with the duration of staining, strongly suggests that this fluorophore is not absolutely specific for phosphoproteins. To test this, the staining pattern obtained with the Pro-Q Diamond stain was compared between ovary proteins extracted with added calyculine A (a phosphatase inhibitor) and a similar extract of ovary proteins treated with alkaline phosphatase for 1 h. The resulting gels are shown in Figure 4. Although the staining of many spots was reduced after pretreatment with alkaline phosphatase (at least 67% of the spots could be counted as reduced or absent after alkaline phosphatase treatment), not all of them were affected. Because of the lack of absolute specificity of the phosphoprotein dye, only those spots that showed a decrease in intensity after alkaline phosphatase treatment were further considered and herein referred to as phosphoproteins detected by the Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain method. Surprisingly, some of the spots showed increased staining after alkaline phosphatase treatment suggesting that, for some proteins, this treatment increased their stainability. The status of these latter as putative phosphoproteins is thus questionable. The staining time and conditions were identical for the two gels.

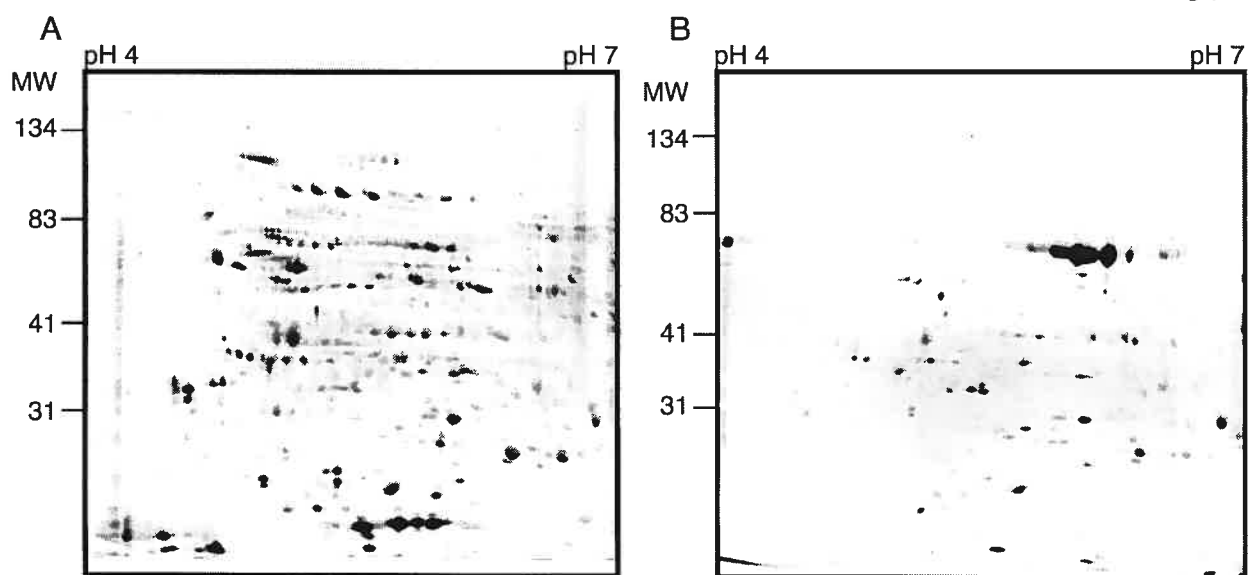


Figure 4: 2-DE patterns obtained with the Pro-Q Diamond phospho-specific stain before and after alkaline phosphatase treatment. A. Pro-Q Diamond stained gel with proteins extracted from ovaries 0 h post-pollination. **B.** Pro-Q Diamond stained gel obtained after pretreatment of the ovary extracted proteins with alkaline phosphatase.

2.3.5 Comparison of the three phosphoprotein detection methods

The phosphoproteins detected with these three detection methods were mapped onto a single gel to clearly visualize the degree of overlap obtained from the different methods (Figure 5). Table 1 and Figure 6 summarize the sensitivity of the three methods used (number of phosphoprotein spots detected) and the different levels of overlap observed. In total, with all phosphoprotein detection methods combined, 262 phosphorylated proteins could be mapped to the 619 proteins detected by Sypro Ruby staining, representing 42% of the total proteins. Among these 262 phosphoproteins, antibodies detected 184 proteins from which only 78 were also detected with either of other two methods (42%). Pro-Q Diamond phosphoprotein stain detected 111 proteins from which 76 were also detected with either of the other two methods (68%). The ^{32}P *in vivo* labeling method detected 90 spots from which 78 were also detected with either of other two methods (87%). Although the antibody detection method could be considered more sensitive from these results, it is also generally considered much less specific, especially for phosphoserine and phosphothreonine residues [31]. This is reflected by a much higher percentage of spots that could not be confirmed by any of the other two methods (58%). Detection with ^{32}P *in vivo* labeling was the more stringent method with the highest confirmation percentage, while ProQ Diamond staining gave an intermediate confidence level. However, even if the stringency of ^{32}P labeling method seems very appealing, this method can present some serious drawbacks when using it for comparative studies in tissues like flower branches. The length of absorption is very long, combined with the fact that ATP turnover is very rapid and that most of phosphorylation/dephosphorylation processes can happen very fast, it is almost impossible to track those instantaneous changes during fertilization with this method. Only 23 proteins were detected with all three methods simultaneously, representing 3.7% of the total proteins and 8.8% of all the phosphorylated proteins detected. These results clearly indicate that although there is no perfect method for phosphoprotein detection, and that some might be more appropriate depending on the tissue used. Confirmation by

alternative methods will significantly increase the assurance in assigning a protein as a phosphoprotein from a 2-DE gel analysis.

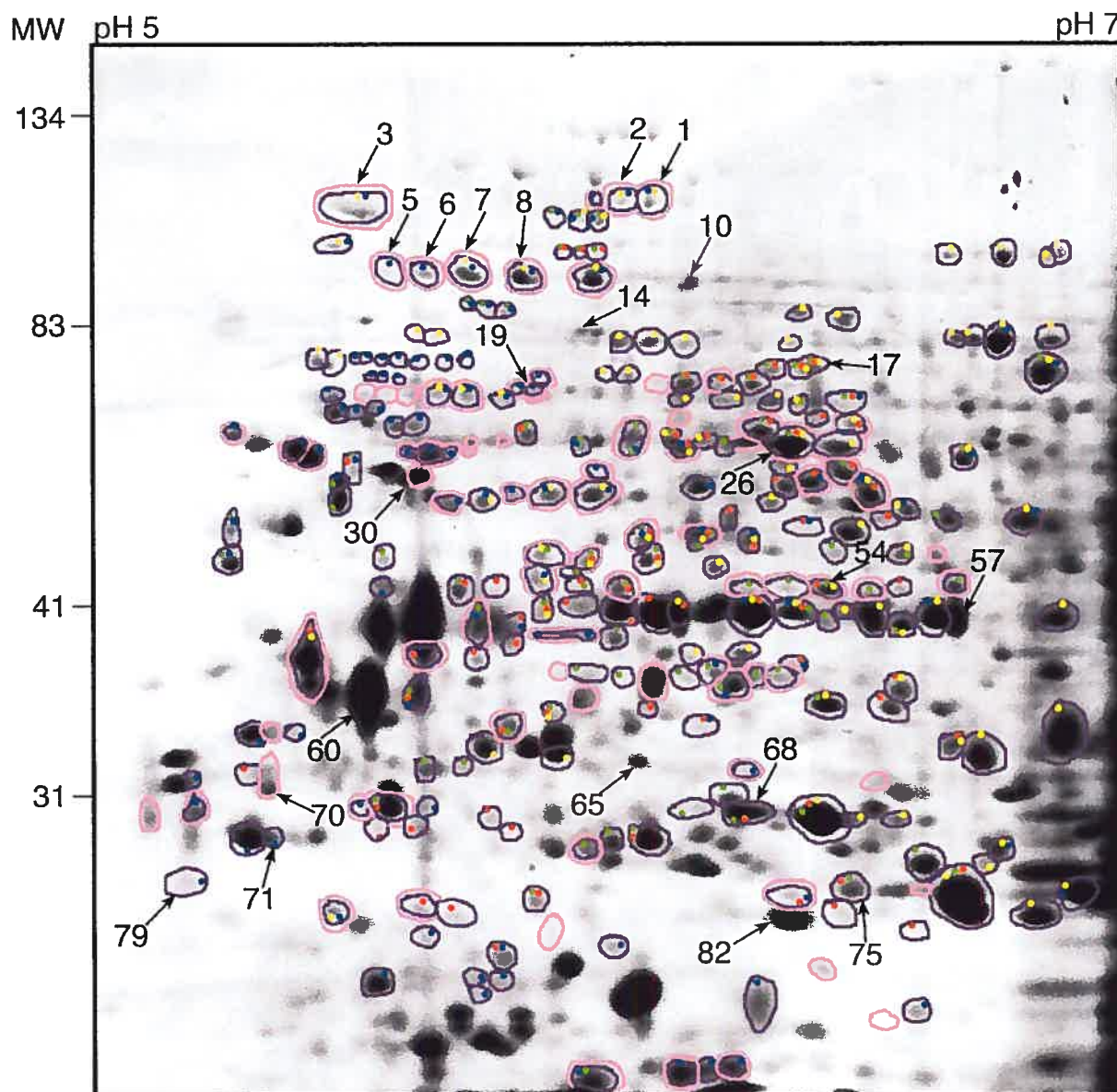


Figure 5: Compilation map of the phosphoproteins detected with the three different detection methods. Phosphoproteins detected by all the different methods were mapped onto a single gel made from proteins extracted from non fecundated ovaries and stained with Sypro Ruby. Spots circled in pink represent phosphoproteins detected with the ^{32}P -orthophosphate *in vivo* labeling method. Spots circled in deep violet represent phosphoproteins detected from non-*in vivo* labeling methods. Dots of different colors represent detection with Pro-Q Diamond (blue dot), anti-phospho-serine antibody

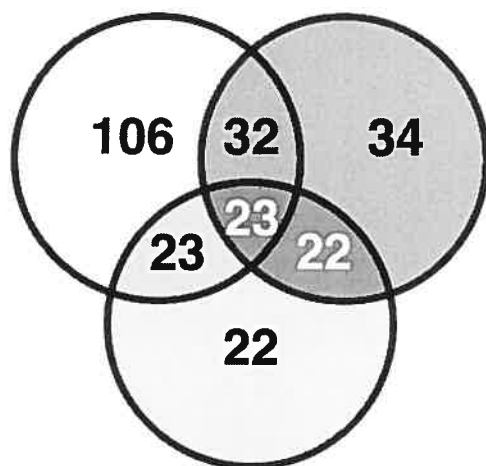
detection (yellow dot), anti-phospho-threonine antibody detection (red dot) and anti-phospho-tyrosine antibody detection (green dot). For the Pro-Q Diamond detection method, only the proteins which had reduced staining after alkaline phosphatase treatment were considered to be phosphoproteins. Arrows with numbers indicate proteins that showed a reproducible variation following fertilization and that were identified by LC-MS/MS.

Detection method used		Total number of protein spots detected	Total number of phosphoprotein spots detected	Number of phosphoprotein spots detected on the Sypro Ruby stained gel	Percentage of phosphoprotein spots ¹
Sypro Ruby staining		619	-	-	-
Ponceau/ Antibody staining	Ponceau/anti P-Ser antibody	206	155	97	15.7
	Ponceau/anti P-Thr antibody	284	284	75	12.1
	Ponceau/anti P-Tyr antibody	357	222	86	13.9
	Proteins detected with at least 1 antibody	-	-	184	29.7
	Proteins detected with anti P-Ser + anti P-Tyr	-	-	23	3.7
	Proteins detected with anti P-Ser + anti P-Thr	-	-	24	3.9
	Proteins detected with anti P-Thr + anti P-Tyr	-	-	36	5.8
	Proteins detected with anti P-Ser + anti P-Tyr + anti P-Thr	-	-	11	1.8
	Detected only by antibody method	-	-	106	17.1
Sypro Ruby/ ³²P staining	All	453	147	90	14.5
	Detected only with ³² P	-	-	22	3.6
ProQ Diamond stain without/with phosphatase	All	353	236	111	17.9
	Detected only with ProQ Diamond method	-	-	34	5.5
Combination of different methods	Phosphoproteins detected by different methods	-	-	262	42.3
	Phosphoproteins detected with all 3 methods	-	-	23	3.7
	Proteins detected with ProQ Diamond + ³² P method	-	-	22	3.6
	Proteins detected with ProQ Diamond + antibody method	-	-	32	5.2
	Proteins detected with antibodies + ³² P	-	-	23	3.7

¹ Determined from the total number of protein spots (619) detected from the Sypro Ruby gel.

Table 1. Comparison of different phosphoprotein detection methods. The total number of protein spots represent those detected with the general protein detection method (Sypro Ruby) on the gel which was latter subjected to a phospho protein detection method. The total number of phosphoproteins represent those detected with the given phosphoprotein detection method on the gel or the membrane. The number of phosphoprotein spots detected on the Sypro Ruby stained gel represent the number of phosphoprotein spots that could be mapped to a Sypro Ruby stained gel (see Figure 5).

Antibodies ProQ Diamond



^{32}P in vivo labeling

Figure 6 : Venn diagram analysis of numbers of phosphoproteins detected with the three different detection methods used and matched on the Sypro Ruby gel.

2.3.6 Analysis of proteins differentially expressed during fertilization

To identify proteins whose expression changes during fertilization, we analyzed 2-D gels containing proteins from ovaries 30, 36, 42, 48 HAP. Thirty (30) HAP was taken as the control time point since fertilization has not yet taken place (pollen tubes have reached from two-thirds of the style to the base of the ovary) but account for pollination effects that can be observed at a distance in the ovary [24, 27]. Most of the ovules are fertilized between 36 HAP to 42 HAP and the entire process is finished by 48 HAP. Different pH ranges of immobilized pH gradient (IPG) strips were tested (data not shown). Protein separation from pI 4 to 7 gave the best results, both in the total number of spots observed and in the overall quality and reproducibility of the 2D gels, and so further analyses were performed using this pH range. Biological triplicates were produced for all time points and only proteins that had the reproducible changes in their expression profiles on all gels were considered. Figure 7 illustrates the gels at 30 HAP and 48 HAP with the proteins that presented reproducible changes. The general pattern was very similar between all the different time points, and overall, only 38 proteins and phosphoproteins presented a reproducible change in their expression profiles as judged by the comparison of their normalized volumes. This was surprising as our previous study indicated that much more genes have a significant change in their expression as judged by their mRNA levels [24]. This can be explained in part by the discrepancies between changes in the abundance of specific mRNAs and their corresponding proteins, as this was previously reported [1-4]. It is also possible that the method used was not sensitive enough to detect some of those proteins, the limitations of 2-D electrophoresis for separation of non abundant and membrane proteins being well known. Within those proteins that showed a reproducible change only 24 had a fold change ≥ 1.4 and were chosen for further identification. A close-up view of these proteins can be seen in Figure 8.

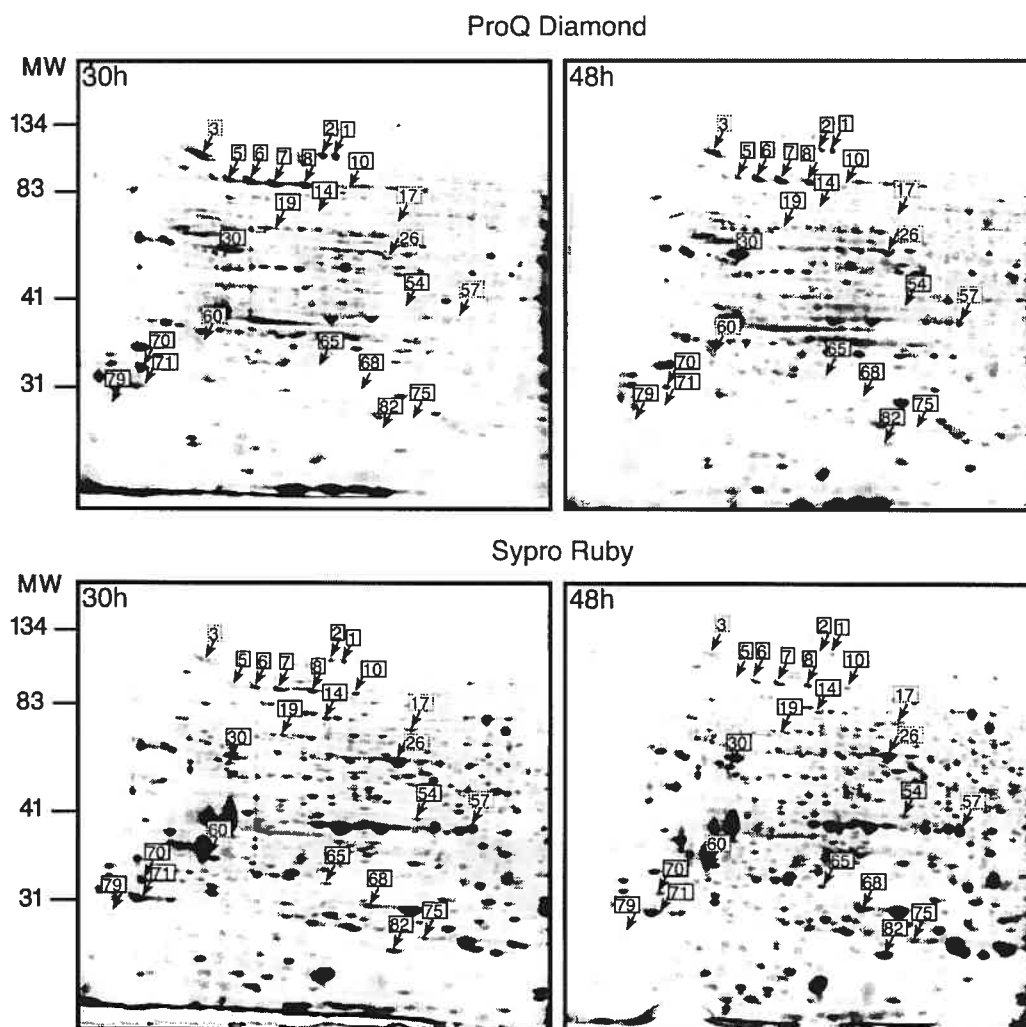


Figure 7: Time-course analysis of protein expression during fertilization as demonstrated by 2-DE. Upper panels: 2-DE gels stained with the phosphoprotein-specific dye. Lower panels: 2-DE gels stained with Sypro Ruby. Left: gels made from total protein extracted from ovaries 30 HAP (fertilization has not yet occurred). Right: gels made from total protein extracted from ovaries 48 HAP (fertilized ovaries). Arrows indicate proteins that showed a reproducible variation following fertilization and that were identified by LC-MS/MS.

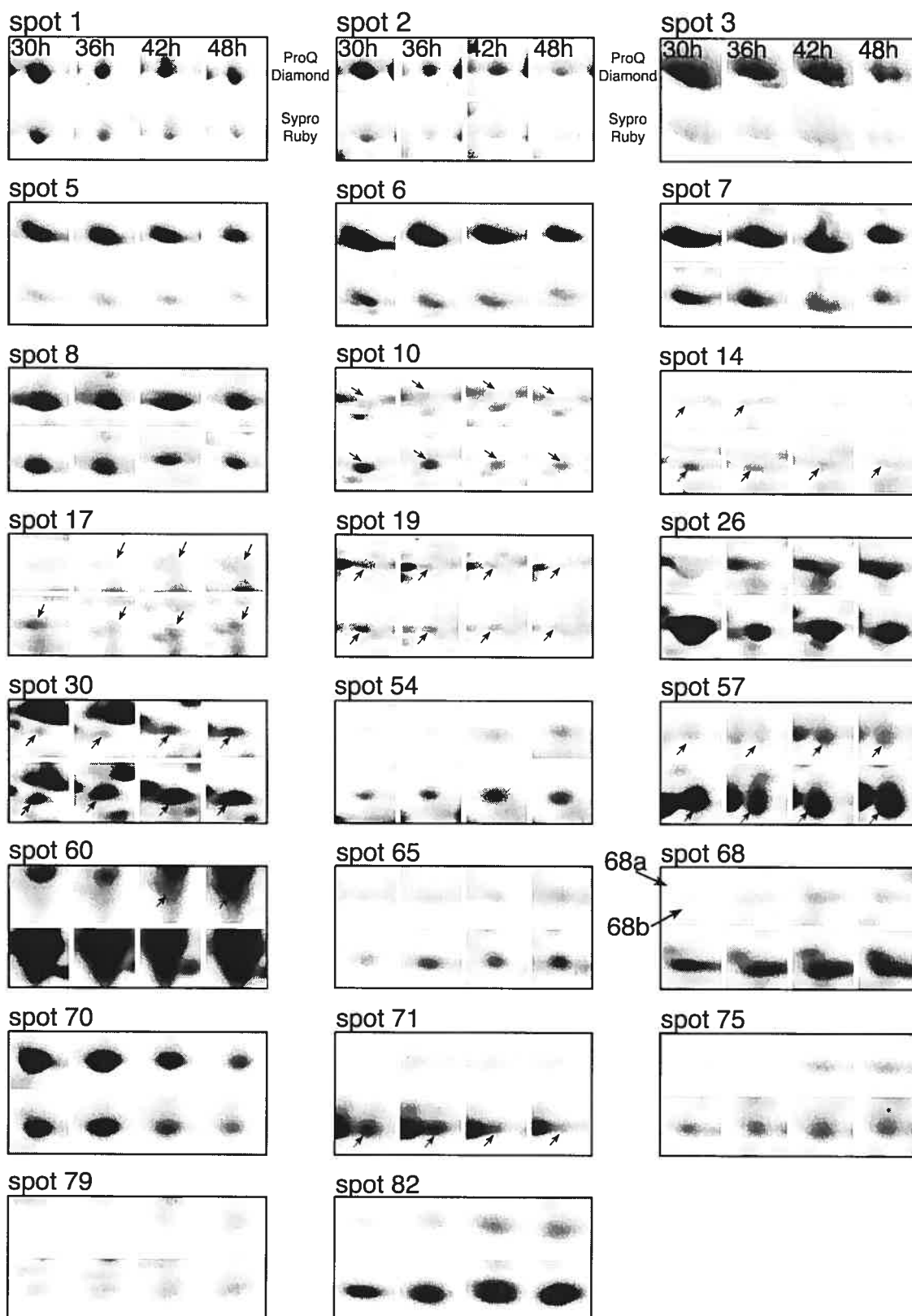


Figure 8: Time-course expression profiles of the proteins that were retained for MS/MS identification. Close-up view of the protein spots shown in Figure 7 and that presented a reproducible change in staining with Sypro Ruby or Pro-Q Diamond. For each spot both the Pro-Q Diamond (top) and Sypro Ruby (bottom) gel portion is displayed before (30 HAP) and after the beginning of fertilization (36, 42, and 48 HAP). When multiple protein spots are present in the close-up view, an arrow indicates which spot is to be followed.

2.3.7 LC-MS/MS identification of the selected proteins

The chosen spots were digested in situ with trypsin and identified by LC-MS/MS. The sequence data was first searched against NCBI nr database using the Mascot engine. When identification failed, further searches were made against the EST others database, and cDNA clones found in the EST others database were then used to search for similarities by protein BLAST. This second search with the EST others database enabled to greatly increase the identification of the protein spots, as only 11 spots out of 24 were identified in the first round, and 13 more in the second. This confirms once again the utility of EST resources in a proteomic study of any species for which a genome sequence is unavailable [32]. While the *S. chacoense* genome has not been sequenced, a vast collection of ESTs from the closely related species *Solanum lycopersicum* (tomato) and *Solanum tuberosum* (potato) are available, as well as ESTs from a *S. chacoense* ovary-specific unigene set [24]. Table 2 shows the protein identifications and, when relevant, which phosphoprotein detection method also detected the protein.

Spot No	GenBank accession number ¹	Identity	Probability based mowse score	Peptides matched/ %coverage	Theoretical MW/pi ²	Experimental MW/pi	Phospho-detection	Fold change Sypro Ruby	Fold change Pro-Q Diamond*	Fold change mRNA levels ³
1	gi 39822762 (gi 22329848)	Potato abiotic stress EST711862. This clone shares 49% identity with an unknown <i>A. thaliana</i> protein with a conserved DUF1296 region.	136	5/21	91/5.69	120/5.75	³² P, Pro-Q, P-Ser	↓3.6	↓1.7	n.a.
2	gi 39831587 (gi 22329848)	Potato abiotic stress EST720687. This clone shares 45% identity with an unknown <i>A. thaliana</i> protein with a conserved DUF1296 region.	83	2/9	91/5.69	120/5.7	³² P, Pro-Q, P-Ser	↓5.3	↓2.7	n.a.
3	gi 14643964 (gi 7267703)	Potato EST519098. This clone shares 60% identity with a putative <i>A. thaliana</i> DNA directed RNA polymerase with a conserved KH domain.	260	6/29	80/4.69	118/5.0	³² P, Pro-Q, P-Ser	↓3.6	↓3.1	n.a.
5	gi 39814700 (gi 15225229)	Potato callus EST741357. This clone shares 64% identity with a nucleic acid binding protein with a conserved KH domain.	558	13/42	65/5.32	108/5.12	³² P, Pro-Q	↓3.0	↓1.9	n.a.
6	gi 39814700 (gi 15225229)	Same EST as spot #5.	553	16/54	65/5.32	108/5.25	³² P, Pro-Q	↓2.1	↓1.8	n.a.
7	gi 39814700 (gi 15225229)	Same EST as spot #5.	621	16/51	65/5.32	108/5.4	³² P, Pro-Q, P-Ser	↓1.9	↓1.4	n.a.
8	gi 39814700 (gi 15225229)	Same EST as spot #5.	648	17/51	65/5.32	108/5.75	³² P, Pro-Q, P-Ser	↓2.3	↓1.6	n.a.
10	gi 39814700 (gi 15225229)	Same EST as spot #5.	434	10/29	65/5.32	108/5.9	-	↓2.8	↓1.9	n.a.
14	gi 7330642	Heat shock 68kD protein, <i>Solanum tuberosum</i> .	653	18/22	73/6.37	83/5.82	P-Ser	↓2.4	↓2.2	↑1.2 (97%)
17	gi 50934039	Putative succinate dehydrogenase flavoprotein α -subunit, <i>Oryza sativa</i> .	315	5/10	69.5/6.61	77/6.15	P-Ser, P-Thr, P-Tyr	1.0	↑7.2 48/42 HAP	↑1.4 (80%)
19	gi 16221	Chaperonin heat shock 60 kD protein, <i>A. thaliana</i> .	371	11/21	62/5.66	72/5.5	³² P, Pro-Q	↓1.7	1.0	↑1.7 (86%)
26	gi 19281	Enolase (cytosolic), tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>).	1257	36/65	48/5.68	62/6.08	³² P, P-Ser, P-Thr, P-Tyr	↓1.3	↑1.4	↑1.5 (94%)
30	gi 39830345 (gi 18398480)	Potato abiotic stress EST719445. This clone shares 76% identities with an unknown <i>A. thaliana</i> protein from the armadillo/ β -catenin repeat family.	414	8/28	40/5.00	56/5.1	³² P	↑1.4	↑2.1	↑1.4 (98%)
54	gi 62891256 (gi 30684727)	Potato in vitro root EST 35087.2. This clone shares 76% identities with an <i>A. thaliana</i> aldose 1-epimerase protein.	257	7/31	37/5.88	41/6.25	³² P, P-Ser, P-Thr, P-Tyr	↑1.3	↑2.1	↑1.5 (97%)
57	gi 10798652	Malate dehydrogenase (cytosolic), <i>Nicotiana tabacum</i> .	448	12/29	36/5.91	38/6.4	-	1.0	↑1.8	n.a.
60	gi 14091665	Ran binding protein-1, <i>Solanum lycopersicum</i> (tomato).	233	11/38	25/4.88	33/4.95	-	1.0	↑1.8	↑1.6 (97%)
65	gi 6058023 (gi 15242465)	Tomato mixed elicitor EST285608. This clone shares 77% identity with an <i>A. thaliana</i> chloroplast inorganic pyrophosphatase.	141	3/11	33/5.72	32/5.75	-	↑2.0	↑2.4 48/36 HAP	↑1.2 (89%)
68a	gi 24636598	Ascorbate peroxidase, <i>Solanum tuberosum</i>	295	8/30	27.4/5.43	31/6.0	P-Thr, P-Tyr	↑1.4	↑4.8 48/36 HAP	↑1.2 (95%)
68b	gi 559005	Ascorbate peroxidase, <i>Nicotiana</i>	294	7/38	27.4/5.43	31/6.1	P-Thr,	↑1.4	↑4.8	↑1.2

		<i>tabacum</i> .					P-Tyr		48/36 HAP	(91%)
70	gi 17432522	Single-stranded DNA binding protein SEBF, <i>Solanum tuberosum</i> .	183	4/17	31/4.65	30/4.62	³² P, Pro-Q	↓2.4	↓2.4	↑1.2 (98%)
71	gi 34907258	Putative nascent polypeptide associated complex α -chain, <i>Oryza sativa</i> .	127	2/13	22/4.39	28/4.62	Pro-Q	↓1.7	-	↑1.4 (85%)
75	gi 28192427	Dehydroascorbate reductase, <i>Nicotiana tabacum</i> .	107	3/14	24/7.7	27/6.18	P-Thr, P-Tyr	↑2.1	↑1.4	n.a.
79	gi 13615355 (gi 7546725)	Potato EST495893. This clone shares 85% identity with the tomato MAF1 gene (MFP1 attachment factor 1).	213	4/28	16/4.34	26/4.4	Pro-Q	↑6.9	↑>10	↑1.3 (98%)
82	gi 5899947 (gi 1743356)	Tomato mixed elicitor EST284057. This clone shares 89% identity with the proteasome delta subunit, <i>N. tabacum</i> .	332	9/37	25/5.18	26/6.06	-	↑1.4	↑3.5	↑1.5 (98%)

¹ When the only match was the EST the GenBank accession number given is of the EST clone and the GenBank accession number of protein to which this clone has the most similarity is given in parenthesis.

² When the only match was the EST, the theoretical molecular weight and pI given were of the proteins to which this EST has the most identity.

³ As determined through cDNA microarray analysis (Statistical analysis using the ANOVA 1-Way Test with a Benjamini and Hochberg multiple testing correction algorithm with a p value ≤ 0.01). For this analysis, the EST from our database closest to the MS/MS match was analyzed and percentage sequence identity is shown in parenthesis.

* Unless otherwise stated, the fold change value was determined between 48 HAP and 30 HAP. When it was impossible to calculate a value for a time point due to faintness, the next one was chosen and indicated in the table.

n.a. Not available in our *Solanum chacoense* EST database and in our 7K *S. chacoense* array set.

N1: One of the identified peptides (LLTQDTFHEVK) is part of the DUF1296 region.

Table 2. List of proteins that present a reproducible change in staining with Pro-Q Diamond or Sypro Ruby identified by LC-MS/MS. Putative names of the identified proteins are listed with the theoretical and experimental molecular masses (MW) in kD and isoelectric points (pI). When appropriate, the phosphoprotein detection methods that detected the protein are indicated (Pro-Q stands for Pro-Q Diamond method with phosphatase treatment, ³²P for ³²P labeling, P-Ser for detection with anti-phosphoserine antibody, P-Thr for anti-phospho-threonine antibody and P-Tyr for anti-phosphotyrosine antibody). Arrows indicate the variation in protein or phosphoprotein steady-state levels: (↑) up-regulated; (↓) down-regulated. The fold change was calculated with Image Master 2D Elite software.

Out of 24 spots sequenced only 5 had not been detected by any phosphoprotein detection method. The fold change variations for both Sypro Ruby and ProQ Diamond stained gels (up- or down-regulated) are also shown in the Table 2. Three identified proteins are involved in protein synthesis and assembly: 1) the heat shock 68 kD protein (HSP 68, spot 14); 2) the heat shock 60 kD chaperonin protein (HSP60, spot 19); and 3) the putative nascent polypeptide associated complex alpha chain (α -NAC) (spot 71). All three proteins were down-regulated in our study (Figures 7 and 8). The HSPs that were identified are molecular chaperones. Their binding to polypeptides helps to fold and assemble them after their synthesis and also to prevent their stress-induced denaturation [33]. Both HSPs seem to be phosphorylated, however HSP 68 was detected only with anti-phospho-Ser antibody while HSP 60 was detected with ^{32}P labeling and Pro-Q Diamond staining. α -NAC is a part of nascent polypeptide associated complex (NAC) composed of α and β chains. NAC can reversibly bind to eukaryotic ribosomes and is probably the first cytosolic protein to contact nascent polypeptide chains emerging from the ribosome [34]. It has been suggested that NAC is involved in protein sorting and translocation and that it can prevent mistargeting of nascent polypeptide chains to the endoplasmic reticulum [35]. Furthermore, several lines of evidence suggested that the α -NAC could function as a transcriptional coactivator [36, 37]. It was also proposed that in animals α -NAC is responsible of controlling FADD, a protein with an important role in apoptosis and other non-apoptotic events [38]. The function of plant NAC still remains largely unknown with the only report proposing that it is a target of salt toxicity [39]. In our study we identified it as a phosphoprotein with two methods, ^{32}P labeling and Pro-Q Diamond staining.

Another three proteins that were identified may have a role in cytoskeleton and cell division: 1) a protein similar to armadillo/ β -catenin repeat family protein (spot 30); 2) a protein similar to the MFP1 attachment factor 1 (MAF1, spot 79); and 3) the Ran binding protein-1 (RanBP1, spot 60). All three proteins were up-regulated during fertilization (Figure 7 and 8). Armadillo (Arm) repeat proteins contain tandem copies of a degenerate protein sequence motif that forms a conserved three-dimensional structure. In animals, armadillo/ β -catenin proteins are implicated in cytoskeletal regulation, binding

directly to the intracellular tail of cadherin through its Arm repeats [40]. The N-terminus of β -catenin in turn interacts with α -catenin [41], which interacts with actin [42]. In addition to their cytoskeletal functions, β -catenin and its homologues act as regulators of gene expression both during development and throughout adult life [43, 44]. They are involved in signaling by the Wnt growth factor recruiting the basal transcription machinery to promoter regions of Wnt target genes [45]. Interestingly, this protein (spot 30) is phosphorylated in plants as detected by the ^{32}P in vivo labeling method. Spot 79, highly similar to the MAF1 protein from tomato, is a small serine/threonine rich protein interacting with MFP1 (Matrix attachment region binding Filament like Protein). It was detected as a phosphoprotein by the Pro-Q Diamond method. MFP1 and MAF1 are components of nuclear substructure that connects the nuclear envelope and the internal nuclear matrix. Interestingly, the tomato MAF1 gene is more strongly expressed in young fruits and flowers [46]. Spot 60, the Ran binding protein 1 (RanBP1) is a protein binding to Ran (Ras-related nuclear small GTP-binding protein). Together with Ran-GTPase-activating protein it promotes the hydrolysis of GTP on Ran. In *Arabidopsis thaliana* At-RanBP1c is critically involved in root growth and development. The promotion of GTP hydrolysis by the Ran/RanGAP/AtRanBP1c complex in the cytoplasm, and the resulting concentration gradient of Ran-GDP to Ran-GTP across the nuclear membrane, could be important in the regulation of auxin-induced mitotic progression in root tips of *A. thaliana* [47, 48]. Overexpression of RanBP1 in mammalian cells induces multipolar spindles through loss of cohesion in mitotic centrosomes. Specifically, RanBP1 excess induces splitting of mother and daughter centrioles at spindle poles; the resulting split centrioles can individually organize functional microtubule arrays, giving rise to functional spindle poles [49]. It is thought that during double fertilization in plants, sperm cells are transported in the embryo sac by a cytoskeletal system [50]. The up-regulation of the proteins related to cytoskeleton in our study would agree with this hypothesis.

Among the other identified proteins, five can be considered as housekeeping enzymes, involved in respiration, citric acid cycle, glycolysis, and energy metabolism: 1) a cytosolic enolase (spot 26); 2) a putative succinate dehydrogenase flavoprotein alpha subunit (spot 17); 3) a protein similar to aldose 1-epimerase family protein (spot 54); 4) a

cytosolic malate dehydrogenase (spot 57), and 5) a chloroplastic inorganic pyrophosphatase (spot 65). During fertilization and early embryogenesis, metabolism becomes highly active as the ovary requires extra energy supplies to start the transformation of the mostly quiescent egg cell (oocyte) into a complex embryo. Enolase, succinate dehydrogenase flavoprotein alpha subunit, aldose 1-epimerase family protein, malate dehydrogenase, and inorganic pyrophosphatase may be important for activation of the entire energy-producing pathway [39, 51, 52]. Enolase seems to be slightly down-regulated as judged from the Sypro Ruby stained gels, but the Pro-Q Diamond staining clearly increases (Figures 7 and 8). Since we can confirm its phosphorylation state with other methods (Figure 5 and Table 2), the increased staining with ProQ Diamond in this case suggests an increase in total phosphorylation of the protein. Enolase was shown to accumulate during mammalian embryogenesis [53] as well as during somatic embryogenesis in *Picea glauca* [32]. In our timeframe, which precedes embryogenesis, a slight decrease in the amount of enolase is observed while it is becoming more phosphorylated. It is possible that phosphorylation activates it during fertilization. We show that it is phosphorylated on serine, threonine and tyrosine residues (Figure 5 and Table 2). Detection of enolase isoforms with different pI values and suggesting post-translation modifications has been shown in rice seedling [54]. Furthermore, a maize enolase has also been shown to be the substrate of a 57 kD dual-specific protein kinase, being mainly phosphorylated on serine and tyrosine residues [55], thus confirming our identification of enolase as a phosphoprotein. The levels of expression of the putative succinate dehydrogenase flavoprotein alpha subunit does not change as judged from total staining, while its phosphorylation state increases as judged with ProQ Diamond staining (Figures 7 and 8). We also confirmed its phosphorylation state by antibodies and it seems to be phosphorylated on serine, threonine and tyrosine residues. The last tree enzymes are up-regulated (Figures 7 and 8). The aldose 1-epimerase family protein (spot 54) is detected as a phosphoprotein through both ^{32}P in vivo labeling and antibody detection, being phosphorylated on serine, threonine and tyrosine residues (Figure 5 and Table 2). Biosynthetic pathways that involve a release of pyrophosphate (PPi) are driven to completion by inorganic PPase-mediated PPi hydrolysis. Since many important

biosynthetic pathways including purines, pyrimidines and starch synthesis are localized in plastids, and contains reaction that generate PPI, chloroplastic inorganic pyrophosphatase may also be of importance in very active tissues like ovaries to drive these reactions in the direction of synthesis, and in eliminating PPI from the chloroplastic compartment [56]. In our study we show that its protein level increases during fertilization (spot 65, Figures 7 and 8).

Two of the identified proteins are involved in oxidative stress: ascorbate peroxidase (spot 68a and b) and dehydroascorbate reductase (spot 75). Ascorbate peroxidase was identified in two spots, maybe representing two different isoforms. Both, ascorbate peroxidase and dehydroascorbate reductase are involved in scavenging of reactive oxygen species (ROS). Those two enzymes are up-regulated in our study (Figures 7 and 8). One possible explanation is that they are produced in response of oxidative burst producing ROS in the degenerated synergids cells after sperm cell penetration or a global increase in metabolism and serve to protect the delicate ovule from those toxic ROS. Alternatively, ROS have been recently been recognized as second messengers for diverse processes like pathogen defense responses, abiotic stress signaling, and polarized cell expansion [57, 58]. Both enzymes were detected as phosphoproteins with the antibody detection method and would be phosphorylated on threonine and tyrosine residues.

The expression of a protein corresponding to the proteasome delta subunit was increased during fertilization (spot 82, Figure 7 and 8). It is known that proteasome activity is closely aligned with cell proliferation processes [32], and its increase could be explained by the increase in total protein synthesis observed immediately following fertilization and the beginning of embryogenesis. It was shown that during later stages of somatic embryo development in *Picea glauca*, some proteasome subunits are down-regulated, which the authors explain by the arrest of the proliferation state and the beginning of the differentiation state in the developing embryo [32]. In our study, the increase observed could correspond to the early proliferation state observed in the embryo, and in particular in the endosperm which starts to divide earlier than the zygote.

Finally, four proteins possibly involved in transcriptional regulation were identified. One of them, identified by two spots (spots 1 and 2) is similar to an unknown protein with a conserved DUF1296 region. Analysis of this protein reveals that it bears a C terminal region rich in glutamine, a common feature of transcriptional activators. The two spots most probably correspond to different phosphorylation states of the same protein. The phosphorylation state of this protein was confirmed by all three methods. The antibody detection method suggests that it would be phosphorylated on serine residues and the protein abundance is down regulated during fertilization (Figures 7 and 8). Two other proteins have a KH domain, which was proposed to be involved in nucleic acid binding [59]. The first one (spot 3) is similar to a putative DNA directed RNA polymerase, and its phosphorylation state was confirmed by all three methods. It also seems to be phosphorylated on serine residues and is down regulated during fertilization (Figures 7 and 8). The second one is an unknown protein with a KH domain and a C terminal rich in glutamine, suggesting that it may act as a transcription factor. It was identified in five different spots (spots 5, 6, 7, 8, 10) suggesting that they correspond to different phosphorylation states of the same protein. Phosphorylation status was confirmed by ^{32}P in vivo labeling and both Pro-Q Diamond and Sypro Ruby staining decrease after fertilization. The last protein (spot 70) corresponded to the SEBF transcriptional repressor, previously shown to negatively regulate the expression of the pathogenesis-related PR-10a gene in potato [60]. SEBF (silencing element binding factor) is homologous with chloroplast RNA binding proteins that possess consensus sequence-type RNA binding domains characteristic of heterogenous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs). This transcriptional regulator has been shown to bind the coding strand of the PR-10a silencing element in a sequence-specific manner. Furthermore, SEBF has been shown experimentally to be the substrate of a purified kinase activity in an in vitro phosphorylation assay from potato tuber extracts (N. Brisson, personal communication). In our study, phosphorylation status of spot 70 was confirmed by ^{32}P in vivo labeling and Pro-Q Diamond staining and both Pro-Q Diamond and Sypro Ruby staining decrease after fertilization, suggesting that de-repression of SEBF target genes might occur rapidly following fertilization. Although only currently

described as a transcription factor involved in defense responses in plants, the SEBF binding site was also found in numerous wound- or stress-inducible genes [60]. A wider role is suggested by the fact that SEBF expression has been detected in ovaries [24]. Furthermore, comparison of the SEBF binding site (PyTGTCNC) with other regulatory elements revealed a strong similarity to the auxin response element (AuxRE; TGTCTC) present in composite AuxRE. Since auxins regulates numerous aspects of plant growth and development including morphogenesis, cell elongation and cell division, this might suggests that this transcriptional repressor indeed has a wider role in plants.

2.3.8 Proteome and transcriptome comparison

Other studies have shown that the transcriptional reprogramming during the reproductive development leads to a significant enrichment of genes encoding proteins involved in metabolism, transcription, and cellular organization [24, 61]. Our study provides additional support for these findings as we show here that the steady-state levels of the proteins involved in those processes are modulated during fertilization. But, as already mentioned in the introduction section, numerous studies have pinpointed the discrepancies between the transcriptional and translational regulation levels. In order to assess this, we have used cDNA microarrays produced from 7741 expressed sequence tags (ESTs) corresponding to 6374 unigenes derived from a fertilized ovary cDNA libraries covering embryo development from zygote to late torpedo stages in *Solanum chacoense* [24]. Of the 18 different proteins obtained from the 24 protein spots sequenced, 14 had highly significant matches in our EST database. The nucleotide sequence percentage identity as well as their fold change are indicated in Table 2. As observed in other studies, there is no clear correlation between variations in mRNA and protein levels. In only half the cases did the mRNA variation observed in line with the protein fold change observed. Furthermore, the mRNA variations observed were very weak, again emphasizing the importance of conducting proteomic analyses to provide critical information on the amount and/or activity of proteins at a given time in a given tissue, or in response to a given stimulus or treatment.

2.4 Concluding remarks

In this study we reported a comparative proteomic analysis of the *S. chacoense* ovary proteins during fertilization. Eighteen different proteins involved in fertilization were identified. Some appear directly implicated in the fertilization process (cytoskeletal proteins), some in the preparation for embryogenesis (*e.g.* proteins from oxidative stress, housekeeping category) while the role of others remains unknown (α -NAC, several new putative transcription factors). This is the first proteomic study of changes during plant fertilization and it provides a starting point for further investigation into functions of proteins involved in fertilization. Deeper proteomic analysis will help us better understand the fertilization mechanism in plants. For example, it would be important to identify the membrane proteins which are believed to play key roles in signal transduction in order to understand the signal transduction during fertilization in plant.

Three different methods for phosphoprotein detection were also compared for their sensitivity and efficiency. We show that, as expected, *in vivo* labeling with ^{32}P is the most stringent method to detect the phosphoproteins, as it shows the highest rate of confirmation with other methods, compared to immunodetection which seemed to identify many more phosphorylated proteins but has a lower rate of confirmation by other methods. ProQ Diamond method could be placed between the two for its specificity, however the specificity of this method was greatly increased by the phosphatase test. We show that the overlap between the three methods is very small, indicating that no one method alone is good enough to be relied upon and that a thorough evaluation of the needs of the experiment (comparative or qualitative study) along with the combination of different methods should be used for phosphoprotein detection during proteomic studies.

2.5 Acknowledgements

For LC-MS/MS protein sequencing we thank Doug Olsen and Andrew R.S. Ross from the Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canada. We also thank Faiza Tebbji for her help in analysis of transcriptome, Martin O'Brien for his help during the *in vivo* labeling and Gabriel Téodorescu for greenhouse plant care and maintenance. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Canada Research Chair program. K. Vydrogon is the recipient of a M. Sc. fellowship from Le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, Québec). D. P. Matton holds a Canada Research Chair in Functional Genomics and Plant Signal Transduction.

2.6 References

- [1] Anderson, L., Seilhamer, J., *Electrophoresis* 1997, *18*, 533-537.
- [2] Anderson, N. L., Anderson, N. G., *Electrophoresis* 1998, *19*, 1853-1861.
- [3] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., *et al.*, *Nat Biotechnol* 1999, *17*, 994-999.
- [4] Ideker, T., Galitski, T., Hood, L., *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001, *2*, 343-372.
- [5] Zivy, M., Vienne, D., *Plant Molecular Biology* 2000, *44*, 575-580.
- [6] Bove, J., Jullien, M., Grappin, P., *Genome Biol* 2002, *3*, REVIEWS1002.
- [7] Weterings, K., Russell, S. D., *Plant Cell* 2004, *16 Suppl*, S107-118.
- [8] Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., Svensson, B., *Plant Physiol* 2002, *129*, 1308-1319.
- [9] Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., *et al.*, *Plant Physiol* 2002, *129*, 823-837.
- [10] Gallardo, K., Le Signor, C., Vandekerckhove, J., Thompson, R. D., Burstin, J., *Plant Physiol* 2003, *133*, 664-682.
- [11] Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J. W., Thelen, J. J., *Plant Physiol* 2005, *137*, 1397-1419.
- [12] Ostergaard, O., Finnie, C., Laugesen, S., Roepstorff, P., Svensson, B., *Proteomics* 2004, *4*, 2437-2447.
- [13] Sheoran, I. S., Olson, D. J., Ross, A. R., Sawhney, V. K., *Proteomics* 2005, *5*, 3752-3764.
- [14] Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Cai, N., Wong, J. H., *et al.*, *Proteomics* 2005, *5*, 1594-1611.
- [15] Okamoto, T., Higuchi, K., Shinkawa, T., Isobe, T., *et al.*, *Plant Cell Physiol* 2004, *45*, 1406-1412.
- [16] Laugesen, S., Bergoin, A., Rossignol, M., *Plant physiology and biochemistry* 2004, *42*, 929-936.
- [17] Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., *et al.*, *Science* 2001, *291*, 1304-1351.
- [18] Zolnierowicz, S., Bollen, M., *Embo J* 2000, *19*, 483-488.
- [19] Initiative, T. A. G., *Nature* 2000, *408*, 796-815.
- [20] Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D. W., Barsam, B., *et al.*, *Plant Physiol* 2002, *129*, 908-925.
- [21] Schulenberg, B., Aggeler, R., Beechem, J. M., Capaldi, R. A., Patton, W. F., *J Biol Chem* 2003, *278*, 27251-27255.
- [22] Schulenberg, B., Goodman, T. N., Aggeler, R., Capaldi, R. A., Patton, W. F., *Electrophoresis* 2004, *25*, 2526-2532.
- [23] Steinberg, T. H., Agnew, B. J., Gee, K. R., Leung, W. Y., *et al.*, *Proteomics* 2003, *3*, 1128-1144.
- [24] Germain, H., Rudd, S., Zotti, C., Caron, S., *et al.*, *Plant Mol Biol* 2005, *59*, 515-532.
- [25] Bradford, M. M., *Anal Biochem* 1976, *72*, 248-254.

- [26] de Nettancourt, D., *Sex. Plant Reprod.* 1997, *10*, 185-199.
- [27] Lantin, S., O'Brien, M., Matton, D. P., *Plant Mol Biol* 1999, *41*, 371-386.
- [28] Rudrabhatla, P., Rajasekharan, R., *Biochemistry* 2004, *43*, 12123-12132.
- [29] Rudrabhatla, P., Reddy, M. M., Rajasekharan, R., *Plant Mol Biol* 2006, *60*, 293-319.
- [30] Luan, S., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, *99*, 11567-11569.
- [31] Raggiaschi, R., Gotta, S., Terstappen, G. C., *Biosci Rep* 2005, *25*, 33-44.
- [32] Lippert, D., Zhuang, J., Ralph, S., Ellis, D. E., *et al.*, *Proteomics* 2005, *5*, 461-473.
- [33] Gimenez-Abian, M. I., Rozalen, A. E., Carballo, J. A., Botella, L. M., *et al.*, *Protoplasma* 2004, *223*, 191-196.
- [34] Beatrix, B., Sakai, H., Wiedmann, M., *J Biol Chem* 2000, *275*, 37838-37845.
- [35] Rospert, S., Dubaquie, Y., Gautschi, M., *Cell Mol Life Sci* 2002, *59*, 1632-1639.
- [36] Moreau, A., Yotov, W. V., Glorieux, F. H., St-Arnaud, R., *Mol Cell Biol* 1998, *18*, 1312-1321.
- [37] Yotov, W. V., Moreau, A., St-Arnaud, R., *Mol Cell Biol* 1998, *18*, 1303-1311.
- [38] Stilo, R., Liguoro, D., di Jeso, B., Leonardi, A., Vito, P., *Biochem Biophys Res Commun* 2003, *303*, 1034-1041.
- [39] Yan, S., Tang, Z., Su, W., Sun, W., *Proteomics* 2005, *5*, 235-244.
- [40] Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., *et al.*, *J Cell Sci* 1994, *107 (Pt 12)*, 3655-3663.
- [41] Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H., Kemler, R., *J Biol Chem* 1996, *271*, 1520-1526.
- [42] Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D., Morrow, J. S., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, *92*, 8813-8817.
- [43] Coates, J. C., *Trends Cell Biol* 2003, *13*, 463-471.
- [44] Stadel, R., Hoffmann, R., Basler, K., *Curr Biol* 2006, *16*, R378-385.
- [45] Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O., Kemler, R., *J Biol Chem* 1999, *274*, 18017-18025.
- [46] Gindullis, F., Peffer, N. J., Meier, I., *Plant Cell* 1999, *11*, 1755-1768.
- [47] Kim, S. H., Arnold, D., Lloyd, A., Roux, S. J., *Plant Cell* 2001, *13*, 2619-2630.
- [48] Kim, S. H., Roux, S. J., *Planta* 2003, *216*, 1047-1052.
- [49] Di Fiore, B., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., *et al.*, *J Cell Sci* 2003, *116*, 3399-3411.
- [50] Cheung, A. Y., Wu, H., Di Stilio, V., Glaven, R., *et al.*, *Ann Bot* 2000, *85*, 29-37.
- [51] Cooley, J. W., Vermaas, W. F., *J Bacteriol* 2001, *183*, 4251-4258.
- [52] Timson, D. J., Reece, R. J., *FEBS Lett* 2003, *543*, 21-24.
- [53] Barbieri, G., De Angelis, L., Feo, S., Cossu, G., Giallongo, A., *Differentiation* 1990, *45*, 179-184.
- [54] Tanaka, N., Mitsui, S., Nobori, H., Yanagi, K., Komatsu, S., *Mol Cell Proteomics* 2005, *4*, 796-808.
- [55] Trojanek, J. B., Klimecka, M. M., Fraser, A., Dobrowolska, G., Muszynska, G., *Acta Biochim Pol* 2004, *51*, 635-647.
- [56] Schulze, S., Mant, A., Kossmann, J., Lloyd, J. R., *FEBS Lett* 2004, *565*, 101-105.
- [57] Carol, R. J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M. C., *et al.*, *Nature* 2005, *438*, 1013-1016.

- [58] Uhrig, J. F., Hulskamp, M., *Curr Biol* 2006, 16, R211-213.
- [59] Nagai, K., *Curr Opin Struct Biol* 1996, 6, 53-61.
- [60] Boyle, B., Brisson, N., *Plant Cell* 2001, 13, 2525-2537.
- [61] Hennig, L., Grisse, W., Grossniklaus, U., Kohler, C., *Plant Physiol* 2004, 135, 1765-1775.

3 Discussion

3.1 La comparaison des différentes méthodes de détection des phosphoprotéines.

La première étape de cette étude était de définir les outils de travail avec les phosphoprotéines. Comme la caractérisation des phosphoprotéines reste encore une tâche difficile et aucune méthode “parfaite” n'a encore été définie pour leur détection (Laugesen et al., 2004), nous avons décidé de comparer trois méthodes différentes de détection de phosphoprotéines pour valider les phosphoprotéines détectées avec ces méthodes. Parmi les méthodes essayées, il y avait les deux méthodes “classiques”: le marquage des protéines phosphorylées *in vivo* où on nourrit les tiges des fleurs avec de l'orthophosphate ^{32}P , qui va s'intégrer au pool de phosphate dans les réactions biochimiques de phosphorylation et nous permettre de voir après séparation sur gel bi-dimensionnel et autoradiographie les protéines phosphorylées; et l'immunodétection qui est une méthode “post-séparation” où après séparation sur gel bi-dimensionnel et transfert sur membrane les phosphoprotéines sont révélées grâce à l'utilisation d'anticorps produits contre les résidus sérine, thréonine ou tyrosine phosphorylés. Une nouvelle méthode de type “post-séparation” a aussi été essayée, consistant en la coloration directe des gels avec un fluorophore spécifique aux phosphoprotéines, le ProQ Diamond Stain.

La méthode de marquage *in vivo* avec l'orthophosphate ne laisse aucun doute quant à sa spécificité et est parfaite pour obtenir une carte des protéines généralement phosphorylées. Il est intéressant de noter qu'avec cette méthode plusieurs points détectés sont organisés en lignes horizontales, suggérant des niveaux de phosphorylation différents pour la même protéine. Cependant certaines limitations rendent cette méthode de marquage *in vivo* difficilement utilisable pour des études de comparaison. Entre autre, un temps d'intégration qui est assez lent (la prise de l'orthophosphate par la tige) qui contraste fortement avec la durée de vie de l'ATP qui est très courte, et le fait que l'état des protéines (phosphorylée versus dephosphorylée) peut changer très vite dans la cellule. Une autre difficulté avec cette méthode est de retracer les protéines phosphorylées sur un

gel duquel elles peuvent être excisées pour identification subséquente. Nous avons vu que seulement 2/3 des points ont pu être associées avec des points de protéines sur le gel coloré au Sypro Ruby (Figure 2 de l'article et Table 1). Ceci s'explique en partie par le fait que certaines des protéines phosphorylées sont présentes en très faibles quantités, en-dessous du niveau de détection possible par le colorant Sypro Ruby. De plus, pour obtenir une image optimale de toutes les phosphoprotéines, les gels doivent être séchés puis autoradiographiés, rendant la tâche de superposition complexe par la suite.

La méthode d'immunodétection a permis de détecter le plus grand nombre de phosphoprotéines. Cependant la spécificité de cette méthode est parfois remise en question, surtout en ce qui concerne les anticorps contre les thréonines et les sérines phosphorylées (Raggiaschi et al., 2005; Wolschin and Weckwerth, 2005). Un avantage intéressant avec cette méthode est qu'elle permet de savoir directement quels acides aminés sont phosphorylés. De cette manière, des protéines phosphorylées simultanément sur des sérines et thréonines, sérines et tyrosines, thréonines et tyrosines, et même sérines, thréonines et tyrosines ont pu être identifiées. Une particularité intéressante a ressorti lors de l'observation des patrons de phosphorylation avec les différents anticorps: même si les phospho-isomères possibles de certaines protéines ont pu être observés en utilisant les 3 anticorps, la détection avec l'anticorps anti-phosphotyrosine avait le patron où presque tous les points étaient organisés en lignes horizontales (Figure 3C de l'article), proposant une phospho-isomérisation multiple pour presque chaque protéine phosphorylée sur le résidu de tyrosine. Si cette interprétation est vraie, cela réduit de quatre fois le nombre de protéines observées phosphorylées sur des tyrosines, car plusieurs points d'une même ligne correspondraient à la même protéine, descendant le chiffre à 50 protéines approximativement. Ce chiffre de 50 protéines phosphorylées sur des tyrosines reste quand même assez important et vient renforcer les dernières découvertes qui montrent que la phosphorylation tyrosique a un rôle important dans la signalisation chez les plantes (revu dans Luan, 2002) . On peut constater avec notre analyse que beaucoup de ces protéines sont en même temps phosphorylées sur des sérines ou des thréonines ou les deux (Figure 3D de l'article), ce qui reste consistant avec les observations actuelles, à savoir que la phosphorylation des tyrosines chez les plantes n'a

pas la même étendue que chez les animaux, et qu'aucune tyrosine kinase similaire à celle des animaux n'a encore été isolée chez les plantes, même si certaines kinases végétales ont été montrées de posséder une activité double Ser/Thr et Tyr (Rudrabhatla et al., 2006).

Nous avons remarqué que le colorant Pro Q Diamond utilisé seul détecte un très grand nombre de protéines que nous suspectons ne pas être toutes des phosphoprotéines. Nous avons donc essayé de l'utiliser sur un échantillon dont les protéines ont été déphosphorylées après l'ajout d'une phosphatase. Comme prévu, un grand nombre de protéines (67%) n'était plus détecté ou présentait une coloration réduite (Figure 4 de l'article). Le fait que 100% des protéines n'aient pas été déphosphorylées peut s'expliquer soit par l'absence d'activité de la phosphatase sur certaines protéines, ou que ces protéines n'étaient pas vraiment des phosphoprotéines, ou encore un mélange des deux. Certaines protéines étaient même davantage colorées après ce test et aucune explication n'a pu être avancée pour expliquer ce résultat (même lors de contacts avec les spécialistes de la compagnie produisant ce fluorophore). Ce test a confirmé que même si le Pro Q Diamond semble détecter les phosphoprotéines, sa spécificité peut être problématique. Cependant, nous avons réussi par la superposition d'images à identifier les protéines dont la coloration a diminué ou complètement disparu après la déphosphorylation, augmentant considérablement de cette manière la spécificité de cette méthode. Ce ne sont que ces protéines dont la coloration a diminué ou disparu après le test de la phosphatase qui ont été considérées dans cette étude comme des phosphoprotéines identifiées avec la méthode ProQ Diamond. Les avantages de cette méthode sont sa reproductibilité et sensibilité, sa capacité de permettre de comparer plusieurs gels avec des échantillons différents ainsi que sa facilité par la suite à retrouver les points d'intérêt pour les exciser et les identifier, ce qui est beaucoup plus difficile à atteindre avec les deux méthodes précédentes.

En conclusion, notons que seulement 23 phosphoprotéines ont été validées avec les trois méthodes simultanément, représentant seulement 8.8% de la totalité des phosphoprotéines identifiées avec les méthodes séparément (Table 1). Aucune des méthodes essayées ne peut être considérée parfaite pour la détection de phosphoprotéines, nous suggérons qu'une bonne évaluation des besoins de l'expérience doit être faite et

plusieurs méthodes différentes doivent être utilisées pour la validation de la détection des phosphoprotéines sur gels 2D.

3.2 Analyse de protéines exprimées de manière différentielle durant la fécondation

Le but de la présente étude était l'identification de protéines et de phosphoprotéines régulées de manière différentielle pendant la fécondation chez les plantes. Pour atteindre ce but nous avons choisi comme plante modèle *Solanum chacoense*, une proche parente de la pomme de terre cultivée et possédant un système d'auto-incompatibilité. Cette barrière reproductive empêche un tube pollinique porteur des mêmes allèles d'incompatibilité exprimés dans le style de la plante réceptrice d'atteindre les ovules et d'effectuer la fécondation (De Nettancourt, 1977, 1997). Cela assure que seulement le pollen génétiquement différent peut féconder la fleur. Ceci permet, en combinaison avec des pollinisations manuelles, la synchronisation de la pollinisation et donc de la fécondation dans une fenêtre de temps limitée. Comme les études précédentes on démontré que chez *S. chacoense* la fécondation a lieu à partir de 36 h après la pollinisation (HAP), et comme la pollinisation peut induire des changements dans l'ovaire à distance avant même l'arrivée du tube pollinique dans l'ovaires (Lantin et al., 1999; Germain et al., 2005), nous avons choisi des ovaires 30 HAP comme témoin, comparés à 36, 42, et 48 HAP où le processus de fécondation est généralement complété dans toutes les ovaires.

Le patron général d'expression de protéines était très similaire entre les différents temps essayés et, en tout, seulement 38 protéines et phosphoprotéines avaient des changements reproductibles dans leurs profils d'expression tel que démontré par la comparaison de leurs volumes normalisés. Ceci est surprenant, car une étude précédente indiquait que beaucoup plus de gènes avaient des changements significatifs dans leur expression si on regardait leurs niveaux d'ARNm (Germain et al., 2005). Cela peut être expliqué en partie par les discordances entre les changements dans l'abondance des ARNm et de leurs protéines correspondantes (Anderson and Seilhamer, 1997; Anderson

and Anderson, 1998; Gygi et al., 1999; Ideker et al., 2001). Il est aussi probable que la méthode utilisée n'était pas assez sensible pour détecter certaines de ces protéines, car les limitations de l'électrophorèse 2D pour la séparation des protéines peu abondantes et membranaires sont bien connues. Parmi les protéines qui avaient un changement reproductible dans leur abondance, seulement celles dont le changement était supérieur à 1.4 fois et plus ($\geq 1.4X$) étaient choisies pour l'identification et parmi ces 24 protéines choisies seulement 5 n'étaient pas détectées avec aucune méthode de détection de phosphoprotéines (Figure 6 de l'article, Table 2).

3.3 Identification des protéines et des phosphoprotéines ayant démontrées une variation dans leur abondance ou leur phosphorylation

Les protéines identifiées on pu être regroupées en classes fonctionnelles différentes. Trois des protéines identifiées sont impliqués dans la synthèse et l'assemblage des protéines: les deux protéines HSP et α -NAC. Les deux HSP identifiés sont des chaperones moléculaires. Leur liaison aux polypeptides aide au repliement et à l'assemblage des protéines après leur synthèse et prévienne aussi leur dénaturation causée par des conditions de stress (Gimenez-Abian et al., 2004). α -NAC fait partie du complexe associé au polypeptide naissant composé de chaînes α et β . NAC peut se lier de manière réversible aux ribosomes eucaryotiques et est probablement la première protéine cytosolique qui entre en contact avec les chaînes polypeptidiques naissantes qui sortent du ribosome (Beatrix et al., 2000). Il a été suggéré que NAC est impliqué dans le triage et la translocation des protéines et qu'il peut prévenir l'envoi erroné des chaînes polypeptidiques naissantes au réticulum endoplasmique (Rospert et al., 2002). Il existe aussi quelque preuves que α -NAC pourrait fonctionner comme co-activateur transcriptionnel (Moreau et al., 1998; Yotov et al., 1998). Chez les animaux il a été

proposé que α -NAC est responsable du contrôle de FADD, une protéine avec un rôle dans l'apoptose et d'autres événements non-apoptotiques (Stilo et al., 2003). La fonction que α -NAC remplit chez les plantes reste de manière générale inconnue. La seule mention du rôle de α -NAC chez les plantes propose que c'est une cible de toxicité saline (Yan et al., 2005). La raison de la diminution d'expression observée de ces protéines durant la fécondation reste obscure.

Trois autres protéines qui ont été identifiées pourraient avoir un rôle dans la formation du cytosquelette et de la division cellulaire: une protéine inconnue similaire aux protéines de la famille aux motifs répétitifs armadillo/ β -catenin, une protéine inconnue similaire à MFP1 attachment factor 1 (MAF1) et la protéine RanBP1 (Ran binding protein-1). Les protéines aux motifs répétitifs armadillo (Arm) contiennent des copies en tandem d'un motif de séquences protéiques dégénérées formant une structure tridimensionnelle conservée. Il a été montré chez les animaux que les protéines armadillo/ β -catenin sont impliquées dans la régulation du cytosquelette en se liant directement à la queue intracellulaire de la cadherine grâce à ses motifs Arm (Aberle et al., 1994), pendant que le N-terminal de la β -catenin interagit avec l' α -catenin (Aberle et al., 1996) qui à son tour interagit avec l'actine (Rimm et al., 1995). En plus de leurs fonctions de régulation du cytosquelette, la β -catenin et ses homologues agissent comme des régulateurs de l'expression génétique durant le développement et à travers la vie (Coates, 2003). Elles sont impliquées dans la signalisation par les facteurs de croissance Wnt en recrutant la machinerie de transcription aux régions promoteur des gènes cibles de Wnt (Hecht et al., 1999). MAF1 est une petite protéine riche en serine/thréonine qui interagit avec MFP1 (Matrix attachment region binding Filament-like Protein). MFP1 et MAF1 sont des composantes de la structure nucléaire qui lie l'enveloppe nucléaire et la matrice nucléaire interne. Il est intéressant de noter que le gène MAF1 de tomate est surtout exprimée dans les fleurs et les fruits (Gindullis et al., 1999). La protéine RanBP1 est une protéine qui se lie à Ran (Ras-related nuclear small GTP-binding protein). Ensemble avec la protéine activatrice de Ran-GTPase elle permet l'hydrolyse de GTP sur Ran. Chez *Arabidopsis thaliana*, At-RanBP1c est impliquée de manière critique dans la croissance et le développement des racines. L'hydrolyse de GTP que le complexe

Ran/RanGAP/AtRanBP1c permet résulte en gradient de concentration de Ran-GDP par rapport à Ran-GTP au travers de la membrane nucléaire ce qui pourrait être important pour la régulation de la progression mitotique induite par l'auxine dans les extrémités racinaires de *A. thaliana* (Kim et al., 2001; Kim and Roux, 2003). La surexpression de RanBP1 dans les cellules des mammifères induit la formation des faisceaux multipolaires grâce à la perte de cohésion dans les centrosomes mitotiques. Plus spécifiquement, l'excès de RanBP1 induit la séparation de la centriole mère et de la centriole fille aux pôles des faisceaux, et les centrioles séparées qui en résultent peuvent individuellement former des « arrays » des microtubules fonctionnelles, donnant naissance à des faisceaux polaires (« spindle poles ») fonctionnels (Di Fiore et al., 2003). Il a été proposé que, durant la double fécondation chez les plantes, les cellules spermatiques sont transportées par le système du cytosquelette (Huang et al., 1993; Cheung et al., 2000). Une plus forte expression de protéines impliquées dans la formation et la régulation du cytosquelette que nous montrons dans cette étude appuieraient cette hypothèse.

Cinq autres protéines identifiées peuvent être regroupées comme des enzymes de base impliquées dans le maintien de la vie de la cellule au niveau de la respiration, du cycle de l'acide citrique, la glycolyse et le métabolisme énergétique: l'énolase cytosolique, une possible sous-unité alpha de la flavoprotéine succinate déshydrogénase, une protéine similaire à la famille de l'aldose 1-épimérase, la malate déshydrogénase cytosolique et la pyrophosphatase inorganique chloroplastique. Durant la fécondation et au début de l'embryogenèse, le métabolisme devient très actif car l'ovaire a besoin de l'énergie supplémentaire pour commencer la transformation de l'oocyte dormant en embryon complexe. Ces protéines pourraient être responsables de l'activation des voies entières de production de l'énergie (Cooley and Vermaas, 2001; Timson and Reece, 2003; Yan et al., 2005). L'expression de l'énolase semble diminuer légèrement si on juge d'après les gels colorés au colorant total Sypro Ruby, pendant que son augmentation de la coloration avec le colorant contre les phosphoprotéines ProQ Diamond Stain signifierait l'augmentation de phosphorylation. Nous confirmons en plus son état phosphorylé par d'autres méthodes. Il a été montré que l'énolase s'accumule durant l'embryogenèse animale (Barbieri et al., 1990) ainsi que durant l'embryogenèse

somatique chez *Picea glauca* (Lippert et al., 2005). Dans notre étude conduite juste avant l'embryogenèse, on observe une diminution légère des quantités d'énolase pendant qu'elle devient plus phosphorylée. Il est possible que l'énolase soit activée durant la fécondation par la phosphorylation. La détection des différentes isoformes de l'énolase avec les différents points isoélectriques et proposant des modifications post-traductionnelles a été montré dans les pousses de riz (Tanaka et al., 2005). En plus il a été montré chez le maïs que l'énolase était le substrat d'une kinase de 57 kD à double spécificité, étant surtout phosphorylée sur sérine et tyrosine (Trojanek et al., 2004), confirmant notre identification de l'énolase en tant qu'une phosphoprotéine. Un autre cas intéressant d'activation par la phosphorylation parmi ces quatre protéines c'est la succinate déshydrogénase. Ses niveaux d'abondance ne changent pas si on en juge par les gels colorés au Sypro Ruby alors que son état de phosphorylation augmenterait jugé par la coloration au ProQ Diamond. Son état de phosphorylation est de plus confirmé par la détection avec les anticorps. Les trois dernières enzymes sont exprimées en plus grande quantité durant la fécondation. Les voies biosynthétiques qui impliquent la libération de pyrophosphate (PPi) sont menées à terme par des pyrophosphatases inorganiques hydrolysant le PPi. Étant donné que beaucoup de voies biosynthétiques incluant les purines, pyrimidines et la synthèse de l'amidon sont localisées dans les chloroplastes, la pyrophosphatase inorganique chloroplastique pourrait être importante dans les tissus très actifs comme les ovaires pour mener ces réactions dans la direction de synthèse, et éliminer le PPi du compartiment chloroplastique (Schulze et al., 2004).

Deux autres protéines dont l'expression augmente dans notre étude sont impliquées dans le stress oxydatif: l'ascorbate peroxidase qui a été identifiée dans deux points différents et présentant donc probablement deux isoformes différentes et la déshydroascorbate réductase. Les deux protéines sont impliquées dans l'utilisation et la transformation de ROS (reactive oxygen species). Il est possible qu'elles soient produites en réponse au stress oxydatif produisant des ROS, toxiques pour l'ovule, durant la mort des synergides lors de l'arrivée du tube pollinique ou l'augmentation globale du métabolisme. Alternativement, il a été montré que les ROS peuvent agir en tant que des messagers secondaires pour des processus divers comme les réponses aux pathogènes,

signalisation des stress abiotiques, et l'expansion des cellules polarisées (Carol et al., 2005; Uhrig and Hulskamp, 2006).

Nous avons aussi identifié la sous-unité delta du protéasome, montrant que son expression augmente durant la fécondation. Il est connu que l'activité du protéasome suit de près les activités de prolifération cellulaire (Lippert et al., 2005), il est donc possible que l'augmentation d'accumulation de cette protéine s'explique par la prolifération cellulaire causée par le début de l'embryogenèse qui suit la fécondation. Il a été montré que durant les stades tardifs de l'embryogenèse somatique chez *Picea glauca*, certaines sous-unités du protéasome voient leur quantité diminuer, ce que les auteurs expliquent par l'arrêt de l'état de prolifération et le début de l'état de différenciation de l'embryon en développement (Lippert et al., 2005). Dans notre cas, l'embryon ne fait que commencer sa prolifération, nos résultats sont donc consistants avec leur conclusion.

Les quatre autres protéines identifiées sont des protéines qui pourraient être impliquées dans la transcription. L'une d'elles est similaire à une protéine inconnue avec un domaine ou région DUF1296 conservée. Le rôle de cette région est inconnu, cependant l'analyse de cette protéine montre qu'elle possède une extrémité C-terminale riche en glutamine, ce qui est commun chez plusieurs facteurs de transcription. Les deux points dans lesquelles nous avons identifié cette protéine correspondent le plus probablement à des états de phosphorylation différents de la même protéine, son état de phosphorylation a en plus été confirmé par les trois méthodes. La détection aux anticorps suggère que cette protéine serait phosphorylée sur des sérines, et l'expression de cette protéine diminue durant la fécondation. Les deux autres protéines possèdent un domaine KH qui a été proposé être impliqué dans la liaison aux acides nucléiques (Nagai, 1996). La première est similaire à une possible polymérase d'ARN se liant à ADN et son état de phosphorylation a aussi été confirmé par les trois méthodes. Elle aussi semble être phosphorylée sur les résidus de sérine et son expression baisse durant la fécondation. La deuxième est inconnue, mais possède une région C-terminale riche en glutamine et pourrait aussi être un facteur de transcription. Elle a été identifiée dans 5 différents points, suggérant qu'ils correspondent à des états différents de phosphorylation de la même protéine. Son statut de phosphorylation a été confirmé par le marquage *in vivo*, et

son expression ainsi que sa phosphorylation semblent diminuer lors de la fécondation. La dernière protéine correspond au répresseur transcriptionnel SEBF (silencing element binding factor). SEBF est homologue avec des protéines chloroplastiques liant ARN qui possèdent les domaines de liaison d'ARN de type de séquences consensus, caractéristiques des ribonucléoprotéides nucléaires hétérogènes (hnRNPs). Une étude précédente montre qu'il régule de manière négative l'expression du gène PR-10a relié à la pathogenèse dans la patate (Boyle and Brisson, 2001). De plus, il a été montré de manière expérimentale que SEBF est le substrat de l'activité d'une kinase purifiée dans une étude de phosphorylation *in vitro* dans des extraits de tubercules de patates (communication personnelle de N. Brisson). Dans notre étude nous confirmons son statut phosphorylé par le marquage *in vivo* et la coloration au ProQ Diamond. Son expression diminue après la fécondation, suggérant qu'une de-repression de la cible de SEBF pourrait arriver rapidement après la fécondation. Malgré que pour l'instant décrit seulement comme facteur de transcription implique dans les réponses de défenses chez les plantes, le site de liaison de SEBF a aussi été retrouvé dans des nombreux gènes induits par le stress ou la blessure (Boyle and Brisson, 2001). Un rôle plus large est suggéré par le fait que l'expression de SEBF a été détectée dans les ovaires (Germain et al., 2005). De plus la comparaison du site de liaison de SEBF (PyTGTCNC) avec d'autres éléments régulateurs a montré une grande similarité avec les éléments de réponse à l'auxine (AuxRE; TGTCTC). Comme les auxines régulent des nombreux aspects de la croissance des plantes et de leur développement incluant la morphogenèse, l'élongation et la division cellulaire, nos résultats pourraient confirmer que ce répresseur transcriptionnel aurait vraiment un rôle plus large chez les plantes.

D'autres études ont déjà montré que la reprogrammation transcriptionnelle durant le développement reproductif conduit à un enrichissement en gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme, la transcription et l'organisation cellulaire (Hennig et al., 2004; Germain et al., 2005). Notre étude appuie d'avantage ces découvertes, montrant l'augmentation de niveaux de protéines appartenant à ces classes. Cependant, comme déjà mentionné plus haut, des nombreuses études ont montré des différences entre les niveaux de transcription et de traduction. Dans notre étude nous

montrons que seulement pour la moitié de protéines dont les paires ont été trouvés dans notre base d'EST les changements de niveaux d'ARNm suivaient la même direction que ceux des protéines (Tableau 2). De plus ces changements d'ARNm étaient très faibles, mettant l'accent encore une fois sur l'importance des études protéomiques quand on cherche à connaître des quantités et/ou activités des protéines dans un tissu spécifique à un moment spécifique, ou encore en réponse à un traitement ou stimulus.

4 Conclusion

Dans cette étude, nous avons comparé trois méthodes différentes pour la détection des phosphoprotéines. Nos résultats démontrent que malgré les avantages et les inconvénients reliés à l'utilisation de chacune de ces méthodes, l'utilisation combinée de ces méthodes permet de cerner avec plus d'assurance les phosphoprotéines potentielles.

Nous avons aussi réalisé une analyse comparative des protéines de l'ovaire de *S. chacoense* lors de la fécondation. Dix-huit protéines régulées différentiellement durant la fécondation ont été identifiées. Certaines de ces protéines pourraient avoir un rôle direct dans la fécondation (les protéines du cytosquelette pour le transport des cellules spermatiques), ou la préparation pour l'embryogenèse (par exemple les protéines du stress oxydatif pour la protection de l'embryon ; les protéines des voies métaboliques majeures pour l'apport de l'énergie), le rôle des autres demeurant inconnu (α -NAC, les possibles nouveaux facteurs de transcription). La production de plantes mutantes pour certaines de ces protéines permettra de mieux cerner leurs fonctions. Cette étude est aussi la première étude protéomique ciblant la fécondation chez les plantes et donne donc un point de départ pour d'autres études cherchant à identifier et à comprendre le rôle des protéines impliquées dans la fécondation. Des analyses protéomiques plus profondes pourraient nous aider à mieux comprendre les mécanismes de fécondation chez les plantes. Il serait par exemple intéressant de se concentrer sur des protéines membranaires

qui sont considérées d'avoir des positions clés pour la transmission du signal pour mieux comprendre la signalisation durant la fécondation chez les plantes.

Trois différentes méthodes pour la détection des phosphoprotéines ont aussi été comparées pour déterminer leur sensibilité et efficacité. Nous montrons, que comme attendu, le marquage *in vivo* avec ^{32}P représente la méthode la plus spécifique, car elle montre le plus grand taux de confirmation avec les autres méthodes, comparé à l'immunodétection qui semble identifier beaucoup plus de protéines mais à un taux de confirmation par d'autres méthodes plus bas. La méthode du ProQ Diamond pourrait être placée entre ces deux pour sa spécificité, cependant la spécificité de cette méthode a été augmentée de beaucoup par le test de phosphatase. Nous montrons que la superposition entre les trois méthodes est très petite, indiquant qu'on ne peut pas se fier à aucune de ces trois méthodes toutes seules, et qu'une bonne évaluation des besoins de l'étude (études de comparaison ou de caractérisation) ensemble avec la combinaison des méthodes différentes sont nécessaires pour les études de phosphoprotéomes.

5 References

- Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H., and Kemler, R.** (1996). Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. *J Biol Chem* **271**, 1520-1526.
- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H.** (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex *in vitro* with recombinant proteins. *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**, 3655-3663.
- Allen, J.F.** (1992). How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? *Trends in biochemical sciences*. **17**, 12-17.
- Anderson, L., and Seilhamer, J.** (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533-537.
- Anderson, N.L., and Anderson, N.G.** (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853-1861.
- Barbieri, G., De Angelis, L., Feo, S., Cossu, G., and Giallongo, A.** (1990). Differential expression of muscle-specific enolase in embryonic and fetal myogenic cells during mouse development. *Differentiation* **45**, 179-184.
- Beatrix, B., Sakai, H., and Wiedmann, M.** (2000). The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* **275**, 37838-37845.

- Bedinger, P.A.** (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**, 879-887.
- Bove, J., Jullien, M., and Grappin, P.** (2002). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol* **3**, REVIEWS1002.
- Bowman, J.L., Drews, G.N., and Meyerowitz, E.M.** (1991). Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell* **3**, 749-758.
- Boyle, B., and Brisson, N.** (2001) Repression of the Defense Gene PR-10a by the Single-Stranded DNA Binding Protein SEBF. *Plant Cell* **13**, 2525-2537.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Carol, R.J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M.C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea, S., Zarsky, V., and Dolan, L.** (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* **438**, 1013-1016.
- Cheung, A.Y., Wu, H., Di Stilio, V., Glaven, R., Chen, C., Wong, E., Ogdahl, J., and Estavillo, A.** (2000). Pollen-Pistil Interactions in *Nicotiana tabacum*. *Ann Bot* **85**, 29-37.
- Christensen, C.A., E.J. King, J.R. Jordan, G.N. Drews.** (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. *Sexual plant reproduction* **10**, 49-64.
- Christensen, C.A., S.W. Gorsich, R.H. Brown, L.G. Jones, J. Brown, J.M. Shaw, G.N. Drews.** (2002). Mitochondrial GFA2 Is Required for Synergid Cell Death in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**, 2215-2232.
- Coates, J.C.** (2003). Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol* **13**, 463-471.
- Coen, E.S., and Meyerowitz, E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.
- Cooley, J.W., and Vermaas, W.F.** (2001). Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function. *J Bacteriol* **183**, 4251-4258.
- Davis, G.L.** (1966). *Systematic Embryology of the Angiosperms.* (New-York: Wiley).
- De Nettancourt, D.** (1977). *Incompatibility in Angiosperms.* (New-York: Springer-Verlag).
- De Nettancourt, D.** (1997). Incompatibility in angiosperms. *Sexual plant reproduction* **10**, 185-199.
- Di Fiore, B., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Tassin, A.M., Cundari, E., and Lavia, P.** (2003). Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. *J Cell Sci* **116**, 3399-3411.
- Ferrario, S., Immink, R.G., and Angenent, G.C.** (2004). Conservation and diversity in flower land. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 84-91.
- Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., and Svensson, B.** (2002). Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiol* **129**, 1308-1319.
- Gallardo, K., Le Signor, C., Vandekerckhove, J., Thompson, R.D., and Burstin, J.** (2003). Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time

- frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol* **133**, 664-682.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., and Job, D.** (2002). Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol* **129**, 823-837.
- Germain, H., Rudd, S., Zotti, C., Caron, S., O'Brien, M., Chantha, S.C., Lagace, M., Major, F., and Matton, D.P.** (2005). A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt. and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant Mol Biol* **59**, 515-532.
- Gimenez-Abian, M.I., Rozalen, A.E., Carballo, J.A., Botella, L.M., Pincheira, J., Lopez-Saez, J.F., and de la Torre, C.** (2004). HSP90 and checkpoint-dependent lengthening of the G2 phase observed in plant cells under hypoxia and cold. *Protoplasma* **223**, 191-196.
- Gindullis, F., Pepper, N.J., and Meier, I.** (1999). MAF1, a novel plant protein interacting with matrix attachment region binding protein MFP1, is located at the nuclear envelope. *Plant Cell* **11**, 1755-1768.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R.** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-999.
- Hajdusch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W., and Thelen, J.J.** (2005). A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol* **137**, 1397-1419.
- Hecht, A., Litterst, C.M., Huber, O., and Kemler, R.** (1999). Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem* **274**, 18017-18025.
- Hennig, L., Gruissem, W., Grossniklaus, U., and Kohler, C.** (2004). Transcriptional programs of early reproductive stages in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 1765-1775.
- Higashiyama, T.** (2002). The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *J Plant Res* **115**, 149-160.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T.** (2003). Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 36-41.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., and Kuroiwa, T.** (1998). Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *torenia fournieri*. *Plant Cell* **10**, 2019-2032.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., and Kuroiwa, T.** (2000). Explosive discharge of pollen tube contents in *Torenia fournieri*. *Plant Physiol* **122**, 11-14.
- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T.** (2001). Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* **293**, 1480-1483.

- Huang, B.-Q., S.D. Russell.** (1992). Synergid degeneration in *Nicotiana*: A quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. *Sexual Plant Reproduction* **5**, 151-155.
- Huang, B.Q., Pierson, E.S., Russell, S.D., Tiezzi, A., and Cresti, M.** (1993). Cytoskeletal organisation and modification during pollen tube arrival, gamete delivery and fertilisation in *Plumbago zeylanica*. *Zygote* **1**, 143-154.
- Ideker, T., Galitski, T., and Hood, L.** (2001). A new approach to decoding life: systems biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**, 343-372.
- Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Jensen, W.A., M.E. Ashton, C.A. Beasley.** (1983). Pollen tube-embryo sac interaction in cotton. In *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*, D.L. Mulcahy, E. Ottaviano, ed (New York: Elsevier Science Publishing), pp. 67-72.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., and Gribskov, M.** (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 908-925.
- Kim, S.H., and Roux, S.J.** (2003). An *Arabidopsis* Ran-binding protein, AtRanBP1c, is a co-activator of Ran GTPase-activating protein and requires the C-terminus for its cytoplasmic localization. *Planta* **216**, 1047-1052.
- Kim, S.H., Arnold, D., Lloyd, A., and Roux, S.J.** (2001). Antisense expression of an *Arabidopsis* ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress. *Plant Cell* **13**, 2619-2630.
- Lantin, S., O'Brien, M., and Matton, D.P.** (1999). Pollination, wounding and jasmonate treatments induce the expression of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Plant Mol Biol* **41**, 371-386.
- Laugesen, S., Bergoin, A., and Rossignol, M.** (2004). Deciphering the plant phosphoproteome: tools and strategies for a challenging task. *Plant physiology and biochemistry* **42**, 929-936.
- Liebler, D.C.** (2002). Introduction to Proteomics. Tools for the New Biology. (Humana Press Inc.).
- Lippert, D., Zhuang, J., Ralph, S., Ellis, D.E., Gilbert, M., Olafson, R., Ritland, K., Ellis, B., Douglas, C.J., and Bohlmann, J.** (2005). Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* **5**, 461-473.
- Luan, S.** (2000). Protein Phosphatases: Structure, Regulation, and Function. In *Plant Protein Kinases*, M. Kreis, J.C. Walker, ed (Academic Press).
- Luan, S.** (2002). Tyrosine phosphorylation in plant cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11567-11569.
- Maheshwari, P.** (1950). An Introduction to the Embryology of Angiosperms. (New York: McGraw-Hill).
- Mariani, C., M. De Beuckeller, J. Truettner, J. Leemans, R.B. Goldberg.** (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* **347**, 737-741.

- Moreau, A., Yotov, W.V., Glorieux, F.H., and St-Arnaud, R.** (1998). Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* **18**, 1312-1321.
- Nagai, K.** (1996). RNA-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 53-61.
- Nawaschin, S.G.** (1898). New observations of fertilization in *Fritillaria tenella* and *Lilium martagon*. The diary of X Symposium of Russian naturalists and physicians **6**, 16-21.
- Nawaschin, S.G.** (1900). On fertilization in Asteraceae and Orchidaceae. *Bull. Imp. l'Acad. Sci. St.Petersburg* **13**, 335-340.
- Okamoto, T., Higuchi, K., Shinkawa, T., Isobe, T., Lorz, H., Koshiba, T., and Kranz, E.** (2004). Identification of major proteins in maize egg cells. *Plant Cell Physiol* **45**, 1406-1412.
- Ostergaard, O., Finnie, C., Laugesen, S., Roepstorff, P., and Sennsson, B.** (2004). Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (pI 4-7). *Proteomics* **4**, 2437-2447.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F.** (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Raggiaschi, R., Gotta, S., and Terstappen, G.C.** (2005). Phosphoproteome analysis. *Biosci Rep* **25**, 33-44.
- Raghavan, V.** (1997). *Molecular Embryology of Flowering Plants*. (Cambridge: Cambridge University Press).
- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D., and Morrow, J.S.** (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8813-8817.
- Roe, J.L., Rivin, C.J., Sessions, R.A., Feldmann, K.A., and Zambryski, P.C.** (1993). The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* **75**, 939-950.
- Rospert, S., Dubaquier, Y., and Gautschi, M.** (2002). Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1632-1639.
- Rudrabhatla, P., Reddy, M.M., and Rajasekharan, R.** (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/ threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol* **60**, 293-319.
- Russel, S.D.** (1992). Double fertilization. *International review of cytology* **140**, 357-388.
- Russel, S.D.** (2001). Female Gametogenesis. In *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*, S.S. Bhojwani, W.Y. Soh, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Schulenberg, B., Aggeler, R., Beechem, J.M., Capaldi, R.A., and Patton, W.F.** (2003). Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* **278**, 27251-27255.
- Schulenberg, B., Goodman, T.N., Aggeler, R., Capaldi, R.A., and Patton, W.F.** (2004). Characterization of dynamic and steady-state protein phosphorylation

- using a fluorescent phosphoprotein gel stain and mass spectrometry. *Electrophoresis* **25**, 2526-2532.
- Schulze, S., Mant, A., Kossmann, J., and Lloyd, J.R.** (2004) Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. *FEBS Lett.* **565**: 101-105.
- Southworth, D., S. Russell.** (2001). Male Gametogenesis. In *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*, S.S. Bhojwani, W.Y. Soh, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Steinberg, T.H., Agnew, B.J., Gee, K.R., Leung, W.Y., Goodman, T., Schulenberg, B., Hendrickson, J., Beechem, J.M., Haugland, R.P., and Patton, W.F.** (2003). Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics* **3**, 1128-1144.
- Stilo, R., Liguoro, D., di Jeso, B., Leonardi, A., and Vito, P.** (2003). The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 1034-1041.
- Tanaka, N., Mitsui, S., Nobori, H., Yanagi, K., and Komatsu, S.** (2005) Expression and function of proteins during development of the basal region in rice seedlings. *Mol Cell Proteomics* **4**, 796-808.
- Theissen, G., and Saedler, H.** (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature* **409**, 469-471.
- Timson, D.J., and Reece, R.J.** (2003). Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS Lett* **543**, 21-24.
- Trojanek, J. B., Klimecka, M. M., Fraser, A., Dobrowolska, G., and Muszynska, G.** (2004) Characterization of dual specificity protein kinase from maize seedlings. *Acta Biochim Pol* **51**, 635-647.
- Uhrig, J. F., and Hulskamp, M.** (2006) Plant GTPases: regulation of morphogenesis by ROPs and ROS. *Curr Biol*, **16**, R211-213.
- van Went, J.L., M.T.M. Willemsse.** (1984). Fertilization. In *Embryology of Angiosperms*, B.M. Johri, ed (Berlin: Springer-Verlag), pp. 273-317.
- Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Cai, N., Wong, J.H., Buchanan, B.B., and Hurkman, W.J.** (2005). Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* **5**, 1594-1611.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan,**

- P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., and Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Walker, J.C. (1993). Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **3**, 451-456.
- Walker, J.C., and Zhang, R. (1990). Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of Brassica. *Nature* **345**, 743-746.
- Wardlaw, C.W. (1955). *Embryogenesis in plants*. (New York: Wiley).
- Weterings, K., and Russell, S.D. (2004). Experimental analysis of the fertilization process. *Plant Cell* **16 Suppl**, S107-118.
- Wilkins, M.R., J.C. Sanchez, A.A. Gooley, R.D. Appel, I. Humphery-Smith, D.F. Hochstrasser, K.L. Williams. (1996). Progress with proteome projects: why all

- proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews* **13**, 19-50.
- Willemse, M.T.M., J.L. van Went.** (1984). The female gametophyte. In *Embryology of Angiosperms*, B.M. Johri, ed (Berlin: Springer-Verlag), pp. 159-196.
- Wolschin, F., and Weckwerth, W.** (2005). Combining metal oxide affinity chromatography (MOAC) and selective mass spectrometry for robust identification of in vivo protein phosphorylation sites. *Plant Methods* **1**, 9.
- Yan, S., Tang, Z., Su, W., and Sun, W.** (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* **5**, 235-244.
- Yotov, W.V., Moreau, A., and St-Arnaud, R.** (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* **18**, 1303-1311.
- Zivy, M., and Vienne, D.** (2000). Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology* **44**, 575-580.
- Zolnierowicz, S., and Bollen, M.** (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *Embo J* **19**, 483-488.

6 Remerciements

Je remercie Daniel P. Matton de m'avoir confié ce projet, de m'avoir dirigé et aidé avec des conseils pertinents, me permettant d'apprendre énormément de choses et d'accomplir un travail dont je suis très fière. Je remercie Martin O'Brien de m'avoir aidé avec le marquage des plantes *in vivo*. Merci à Hugo Germain, Eric Chevalier, Sier-Ching Chanta, Geneviève Major, Sébastien Caron, Madoka Grey-Mitsumune, et Christelle Kapfer pour le partage de leurs connaissances, des conseils ainsi que le support moral dans la vie de laboratoire de tous les jours. Je remercie Doug Olsen et Andrew R.S. Ross de "Plant Biotechnology Institute" à Saskatoon pour le séquençage LC-MS/MS des protéines. Un énorme merci à ma famille : mes parents qui n'ont pas arrêté de m'inciter à aller au bout de cet épreuve, ma sœur pour le support moral énorme, Martin Levasseur de m'avoir supporté et écouté à tous les jours ainsi que pour les corrections de ce travail, vous m'avez donné l'énergie de mener ce projet à bout. Je remercie aussi Le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, Québec) d'avoir financé ce projet.