

2m11.2808.8

Université de Montréal

**Caractérisation biochimique et moléculaire des composantes peptidiques
structurales des plasmodesmes des veines mineures des cotylédons de
*Cucurbita pepo***

**Par
Iris Saliba**

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

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

Avril 2000

© Iris Saliba, 2000



8.8085.11ms

PK

3

U54

2000

V.005

Université de Montréal

Établissement d'enseignement et de recherche de niveau universitaire
Établissement des programmes de premier cycle

Commissaire

Nat

1971-1972

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Algorithme présenté à la Faculté des Sciences Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Baccalauréat en Sciences (B.Sc.)

en Sciences Biologiques

1971-1972

1971-1972



Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation biochimique et moléculaire des composantes peptidiques
structurales des plasmodesmes des veines mineures des cotylédons de
*Cucurbita pepo***

Présenté par

Iris Saliba

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

MORSE, Jarid - Président
BEEBE, Dwight Upson - Directeur de
recherche
BARABÉ, Denis - membre
~~MOR~~
SAINI - Har surdeep S. - Co-directeur

Mémoire accepté le:

00-11-09

SOMMAIRE

Une des conditions requises pour une organisation multicellulaire chez les plantes est la communication intercellulaire. Les voies les plus probables pour une interaction cellule- à- cellule chez les végétaux sont les plasmodesmes. Vus sur des coupes microscopiques, ces structures ressemblent à des cylindres incrustés dans la paroi cellulaire. Les plasmodesmes sont en fait des pores traversant la paroi cellulaire, qui sont doublés d'une membrane plasmique par lesquels le cytoplasme et le système endomembranaire de cellules adjacentes sont interconnectés pour former un continuum symplastique. La communication réalisée par les plasmodesmes est importante pour le contrôle et la coordination du développement et des activités métaboliques. Les plasmodesmes sont également une voie commune

pour la transmission intercellulaire de certains virus végétaux lors de l'infection.

Une question centrale de la recherche sur les plasmodesmes est la nature même des composantes structurelles des plasmodesmes. Durant la dernière décennie, plusieurs laboratoires ont tenté d'isoler et d'identifier une ou plusieurs de ces composantes. À part l'actine et la myosine qui ont été reconnues dans la majorité des plasmodesmes, les protéines sont des constituantes majeures des plasmodesmes. Elles sont des composantes intégrales de la membrane plasmique qui double le plasmodesme ainsi que du réticulum endoplasmique qui le traverse. Selon des études récentes, ces protéines contrôlèrent même l'ouverture et la fermeture des plasmodesmes qui, contrairement à ce qu'on pensait jusqu'à tout récemment, sont des structures actives et non passives.

Nous avons identifié un petit groupe de protéines qui ont été isolées d'une fraction de parois cellulaires enrichie en plasmodesmes et provenant des veines mineures de *C. pepo*. Durant nos expériences d'immunolocalisation, des anticorps polyclonaux, dirigés contre ces protéines, ont réagi fortement et spécifiquement avec les plasmodesmes.

Nous avons isolé, caractérisé et séquencé une protéine inconnue de 38 kDa, à partir de tests et d'expériences de nature biochimique, qui nous ont permis d'émettre l'hypothèse suivante: la protéine de 38 kDa est sûrement impliquée dans la structure des plasmodesmes. Nous n'avons malheureusement pas fait réagir cette protéine immunologiquement avec les plasmodesmes. Cependant, le travail entrepris durant ce projet de maîtrise nous a permis de mettre au point une méthode rigoureuse pour l'isolation d'une protéine plasmodesmatale.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xv
INTRODUCTION.....	1
Les plasmodesmes.....	2

Biogenèse des plasmodesmes.....	2
Structure et transport à travers les plasmodesmes.....	5
Fonction des plasmodesmes.....	10
Les cotylédons de <i>C. pepo</i>.....	12
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	16
Matériel végétal.....	16
Extraction des protéines.....	22
Extraction régulière.....	22
Extraction en série.....	22
Culture <i>in vitro</i>.....	23
Culture des plantes axéniques.....	23
Digestion immobile et technique de flottaison.....	26
Culture des protoplastes.....	27
Séparation de phase au Triton X-114.....	27
Colorations au nitrate d'argent et au Bleu de Coomassie.....	28
Électrophorèse et transferts de type Western.....	29
Identification des protéines des parois cellulaires.....	29
Identification des protéines glycosylées versus les protéines non-glycosylées.....	30
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	31
Procédés de solubilisation de la membrane.....	31
Les détergents.....	31
Séparation de phase au Triton X-114.....	35
Les protoplastes.....	44
Formation des plasmodesmes dans les protoplastes en régénération.....	44
Les contaminants protéiques du matériel végétal.....	49
La protéine de 38 kDa.....	52

Test de glycosylation.....	53
Les jeunes cotylédons.....	57
L'extraction au CaCl₂.....	61
Extractions en série.....	66
Séquençage de la protéine de 38 kDa.....	70
CONCLUSION.....	78
RÉFÉRENCES.....	81

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I:** Tableau de quelques propriétés des détergents utilisés au cours de ce mémoire.
- Tableau II:** Classification des protéines extraites au SB 1x, selon leur présence dans la phase aqueuse, la phase de détergent ou dans les deux phases à la fois, conformément à l'expérience de séparation de phase au Triton X-114.
- Tableau III:** Tableau des protéines extraites avec le CHAPS 2% ou le Triton X-100 2% qui sont présentes dans les jeunes cotylédons et absentes dans les cotylédons matures de *C. pepo*.

Tableau IV: Liste des protéines partageant une homologie de séquence avec la protéine de 38 kDa.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Modèle de la composition physique et chimique des plasmodesmes.
- Figure 2:** Préparation du matériel végétal.
- Figure 3:** États de la paroi cellulaire.
- Figure 4:** Extraction en série avec division des culots.
- Figure 5:** Extraction en série sans division des culots.
- Figure 6:** États de la paroi cellulaire (suite).

- Figure 7:** Séparation au Triton X-114 des protéines préalablement extraites au SB, au Triton X-100 ou au CHAPS, en phases aqueuse et détergent.
- Figure 8:** Séparation imprécise des deux phases, effectuée par pipetage, laissant une fine couche de la phase aqueuse au-dessus de la phase de détergent.
- Figure 9:** Présence de pd ramifiés discontinus dans la fine et nouvelle paroi cellulaire, dans les sillons formés par deux cellules divisées ou deux cellules en fusion.
- Figure 10:** Extraction des protéines des parois cellulaires des protoplastes de *C. pepo*.
- Figure 11:** A: Test de détection de la Rubisco. B: Les protéines de l'exudat du phloème de *C. pepo*.
- Figure 12:** Détection des glycoprotéines parmi les protéines des veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites au SB 1x.
- Figure 13:** Extraction et migration sur gel polyacrylamide des protéines des veines mineures des cotylédons matures et immatures de *C. pepo*.
- Figure 14:** Extraction des protéines des veines mineures de *C. pepo* au CaCl_2 .

Figure 15: Patron sur gel de polyacrylamide d'une extraction en série comparée avec une extraction régulière.

Figure 16: Patron protéique des extractions en série des protéines des veines mineures de *C. pepo*, migrées sur gel de polyacrylamide de 12x16 cm.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CA	acide ϵ -amino-n-caproïque
CHAPS	3- [(3- cholamidopropyl) diméthyl- ammonio]-1- propane sulfonate
cmc	concentration critique des micelles
cmt	température critique des micelles
cp	point de condensation
<i>C. pepo</i>	<i>Cucurbita pepo</i>
DEF	DEFICIENS, facteur de transcription
DTT	dithiothréitol
EDTA	tétraacétate de disodium et d'éthylènediamine
fig.	Figure
GLO	GLOBOSA, facteur de transcription

HLB	balance hydrophile- lipophile
kDa	kilodalton(s)
KN1	knotted-1, facteur de transcription
M	molaire
MET	microscope électronique à transmission
mM	millimolaire
nm	nanomètres
p.	page
p-AB	p- aminobenzamidine
pd	plasmodesme
PM	protéine de mouvement
pmol	picomolaire
PMSF	phénylméthyle sulfonyl fluoride
PVDF	membrane de fluorure de polyvinylidène
RE	réticulum endoplasmique
rpm	révolutions par minute
SB (1x/ 2x)	Laemmli Sample Buffer, contenant 4% de mercaptoéthanol, et 1 ou 2x SDS, pour SDS- PAGE
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS- PAGE	SDS- électrophorèse en gel de polyacrylamide
Tris	tris (hydroxyméthyle) aminométhane
Triton	Octylphénoxy polyéthoxyéthanol
Tween 20	polyoxyéthylène (20) sorbitane monolaurate
µm	micromètres
VMC	virus de la mosaïque du concombre
VMP	virus de la mosaïque du pois
VMCF	virus de la mosaïque du chou- fleur
VML	virus de la mosaïque de la laitue
VMT	virus de la mosaïque du tabac

REMERCIEMENTS

Je ne garde que de bons souvenirs de l'IRBV...

Si je devais reculer dans le temps et recommencer à nouveau, je ne changerais qu'une seule chose: la machine à café de la cafétéria!

Merci à mon directeur de recherche Dr. Dwight Beebe, qui m'a supportée de proche et de loin malgré les circonstances très particulières qui sont apparues vers la fin de ma maîtrise. Dwight, il fût incroyablement agréable de travailler avec toi.

Je remercie particulièrement Dr. Deep Saini de m'avoir acceptée dans son laboratoire et d'avoir réglé mon sort. Merci Deep pour ton attention et ta bonne humeur.

Enfin et non pas le moindre, merci aux amis pour le bon temps ensemble... Jihad, Marie, Sier- Ching, Félix... Vous me manquerez beaucoup de l'autre côté du continent!

Je n'oublie surtout pas ma famille, avec moi où je vais et quoi que je fasse, ainsi que mon fiancé qui m'attend depuis trois ans...

**Aux enfants de la guerre,
Aux rêves brisés,
À l'amour teinté,
Aux succès inachevés,
Aux héros oubliés,
À l'espoir déchiré,
Aux soldats blessés,
Aux plaisirs de la vie,
Au futur gris,
Aux gens de mon pays,
Aux souvenirs ternis,
À tous ceux qui ont fui,
Aux deuils à perpétuité,
À une fierté rabaisée,
Aux larmes qui ont coulé,
Aux origines déracinées,
À un peuple fatigué,
À ceux qui n'ont pu s'en échapper,
À ceux qui m'en ont sauvée...**

Je dédie mon mémoire à Georges et Wafaa

INTRODUCTION

La communication intercellulaire est à la cellule ce que les téléphones, la poste, les faxes et les modems représentent à notre société moderne: un facteur absolument essentiel à l'organisation multicellulaire. Sans communication entre les cellules, un organisme multicellulaire n'a pas la possibilité d'exister et ne peut plus ni se diviser, ni se différencier, ni croître. Une cellule végétale exprime son identité génétique grâce à la communication qui règne entre le noyau et le cytoplasme via les pores nucléaires. De plus, cette cellule exprime son identité physique et sa position dans l'organisme par son interaction avec ses cellules voisines. En effet, le trafic des molécules d'information entre cellules voisines détermine la nature et la fonction de chaque cellule (Sussex 1989, van den Berg *et al.* 1995). Cet échange peut se faire à travers des canaux intercellulaires nommés plasmodesmes (pd). Ces

canaux, enchâssés dans la paroi cellulaire reliant les cytoplasmes des cellules végétales en un continuum appelé symplaste, coordonnent l'expression des gènes entre cellules en régulant le passage de macromolécules. La régulation de ces dernières se fait par la structure, la fréquence et la taille d'exclusion moléculaire des pd. Ces trois facteurs établissent ce qu'on appelle les domaines symplasmiques (McLean *et al* 1997). Il ne faut pas oublier par contre que la paroi cellulaire joue aussi un rôle dans la transmission de signaux entre cellules (Hake et Char 1997).

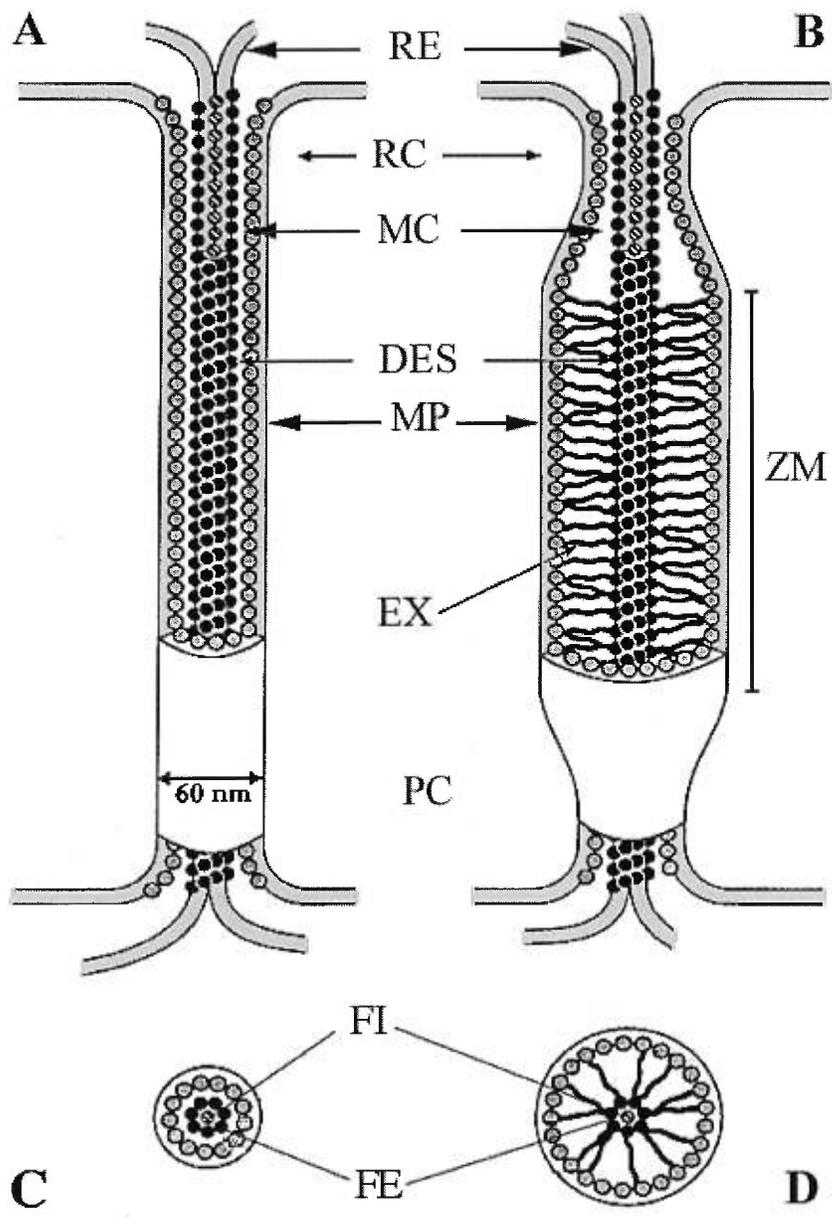
Les plasmodesmes

Biogenèse des plasmodesmes

Il existe deux types de pd: les pd primaires et les pd secondaires. Les deux sortes peuvent être simples ou ramifiées. Les pd primaires prédominent dans les jeunes tissus. Ils ressemblent à de simples canaux tel qu'illustré dans la figure 1. Ils sont créés pendant la formation de la plaque cellulaire lors de la cytokinèse. Le réticulum endoplasmique (RE), positionné perpendiculairement à la plaque cellulaire, est piégé par cette dernière qui est en formation, d'où la continuité cytoplasmique entre les cellules (Lucas *et al.* 1993). Ainsi les pd primaires sont le résultat d'une séparation incomplète entre deux cellules filles. Bien que les pd primaires soient majoritairement simples, ils sont, dans les tissus plus vieux, ramifiés. La ramification des pd primaires a lieu lorsque des pd primaires simples se fusionnent ensemble, dû à une digestion locale de la paroi cellulaire (Jones 1976, Ding *et al.* 1992). Il est impossible de distinguer morphologiquement un pd primaire d'un pd secondaire, lorsque les deux sont ramifiés.

Pour ce qui est des plasmodesmes secondaires, ils sont plutôt prédominants dans les tissus plus vieux. En général ils sont ramifiés mais ils

Figure 1: Modèle de la composition physique et chimique des plasmodesmes (adapté de Lucas *et al.* 1993). **A:** Vue longitudinale du pd nouvellement formé. **B:** Vue longitudinale du pd au cours de sa maturation. **C:** Vue transversale représentant un pd nouvellement formé. **D:** Vue transversale représentant la région médiane d'un pd au cours de sa maturation. RE: réticulum endoplasmique, RC: région du col, MC: manchon cytoplasmique, DES: desmotubule, MP: membrane plasmique, EX: extensions, ZM: zone médiane, FI: feuillet interne, FE: feuillet externe.



peuvent aussi bien ne pas l'être. La différence clé entre les pd primaires et les pd secondaires est le moment auquel ils se sont formés par rapport à la paroi cellulaire. Les pd secondaires se sont formés après la déposition de la paroi cellulaire, contrairement aux pd primaires qui se forment pendant la formation de la paroi cellulaire. Les pd secondaires se forment donc durant le développement normal de la plante aussi bien que dans des systèmes un peu spéciaux comme dans les plantes chimères, les unions de greffes et les protoplastes en fusion.

Il existe une panoplie très diversifiée en ce qui concerne les différentes formes des pd secondaires. De façon générale cependant, ils sont caractérisés par de nombreux canaux qui se rejoignent en un seul canal plus large que les autres (Ehlers et Kollmann 1996). Le mécanisme de formation des pd secondaires n'est pas encore clair. Selon Jones (1976), les pd secondaires se frayeraient un chemin grâce à une digestion enzymatique à travers l'épaisse paroi cellulaire. Cette hypothèse est mise en question par Monzer (1990, 1991) ainsi que Kollmann et Glockmann (1991) qui se basent sur des études de culture de protoplastes et d'observation d'interfaces de greffes. Ces auteurs suggèrent que la formation des pd secondaires résulterait d'une fusion des vésicules de Golgi avec la membrane plasmique.

Structure et transport à travers les plasmodesmes

Depuis plusieurs années, la structure microscopique des pd a fait l'objet de nombreuses études de microscopie électronique (Robards et Lucas 1990, Lucas *et al.* 1993). Vulgairement décrit, le pd est un canal à travers la paroi cellulaire, tapissé de la membrane plasmique et traversé par le manchon de RE appelé desmotubule. Cependant, des études récentes de Waigmann *et al.* (1997) suggèrent qu'à la place du desmotubule au centre du pd, se trouverait une structure tubulaire composée entièrement de protéines. Ainsi

grâce au pd, les cytoplasmes de toutes les cellules avoisinantes sont reliés entre eux, puisque la membrane cytoplasmique elle-même forme un continuum d'une cellule à une autre. Des images prises à haute résolution ont montré que des particules peptidiques de 3 nm de diamètre sont enchâssées dans la membrane plasmique ainsi que dans la membrane du RE traversant le pd. Ces deux dernières seraient donc connectées par des extensions. Ces extensions ont été observées chez plusieurs espèces en coupe transversale (Ding *et al.* 1992, Schulz 1995, Cook *et al.* 1997) et en coupe longitudinale (Ding *et al.* 1992). Elles seraient formées de myosine comme il a été démontré chez *Chara Corallina* (Blackman et Overall 1998). Il est possible que les microfilaments de myosine servent à ouvrir et rétrécir le manchon cytoplasmique.

La callose, un glucane- β -1,3, se dépose entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire en réponse aux blessures ou aux fixations (Radford *et al.* 1998). Elle peut agir comme un sphincter pour relâcher ou resserrer le pd. Finalement, Overall (1999) suggère la présence de protéines contractiles, probablement de centrine, dans la région du col du pd, reliant la membrane plasmique au RE.

De plus, tout comme les protéines filamenteuses reliant les protéines globulaires de la membrane cytoplasmique et du feuillet externe du desmotubule entre elles (Botha *et al.* 1993), Goshroy *et al.* (1997) rapportent la présence de telles protéines filamenteuses entre le feuillet interne et le feuillet externe du desmotubule. Ces protéines seraient attachées aux protéines globulaires qui composent les deux feuillets. Les espaces entre les deux types de protéines forment des microcanaux de 2.5 nm de diamètre et servent probablement au transport intercellulaire. Selon les travaux de Gamalei (1994), le transport intercellulaire peut même avoir lieu entre les couches

membranaires et à travers le lumen du RE. Dans tous les cas, le transport passif à travers les pd permet, en temps normal, le passage des molécules de seulement 1 kDa (Wolf *et al.* 1989).

La limite d'exclusion moléculaire est révélée grâce à des expériences de transport de dextrans couplés à des colorants fluorescents. Waigmann *et al.* (1997) par exemple, proposent une limite d'exclusion moléculaire de 7 kDa pour le transport intercellulaire dans les trichomes de *Nicotiana clevelandii*. Kempers et van Bel (1997), quant à eux, ont montré que les pd situés entre les éléments du tube criblé et les cellules compagnes de la tige de *Vicia faba* possèdent une limite d'exclusion moléculaire d'au moins 10 kDa. Cette limite d'exclusion moléculaire varie donc d'une espèce à l'autre et explique le passage passif chez les pd.

La perméabilité passive peut être diminuée par différents facteurs chimiques: les cations divalents (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+}), les esters de phorbol, les acides aminés aromatiques et les phosphoinositides (Baron- Eppel *et al.* 1988, Erwee et Goodwin 1984, Lucas *et al.* 1993, Tucker 1988). Certains facteurs environnementaux comme la lumière, la température ou l'anaérobiose, ont aussi un rôle à jouer dans l'inhibition du transport à travers les pd ou l'augmentation de la taille d'exclusion moléculaire. Cependant, le mécanisme le plus étudié ces dernières années est celui de l'augmentation de la taille d'exclusion moléculaire par les virus.

Il existe des virus qui forment des structures tubulaires à travers la paroi cellulaire. Parmi ces virus il y a, par exemple, le virus de la mosaïque du pois (VMP) (Kasteel *et al.* 1997), le nepovirus «fan leaf» de la vigne (Ritzenthaler *et al.* 1995) et le virus de la mosaïque du chou- fleur (VMCF) (Perbal *et al.* 1993). C'est la protéine de mouvement (PM) de tels virus, en

présence ou en absence du virus en particulier, qui induit la formation des structures tubulaires. Toutefois, les virus qui nous intéressent sont ceux qui empruntent les voies plasmodesmatales intercellulaires et qui ne forment pas cette structure tubulaire nécessaire à leur propagation d'une cellule à une autre.

Ces autres virus utilisent le mécanisme de trafic des macromolécules endogènes et s'en servent à leur gré pour leur propagation. Le virus de la mosaïque du tabac (VMT), qui est de loin le virus le plus étudié de ce groupe, est assisté par sa PM de 30 kDa qui facilite son transport de cellule en cellule (Ding *et al.* 1992). Grâce aux microinjections de dextrans fluorescents, les travaux de Wolf *et al.* (1989) ont démontré que la taille d'exclusion moléculaire des pd dans les cellules du mésophylle varie de 1 kDa à 10 kDa. Par conséquent, la protéine de mouvement du VMT interagit avec les pd pour augmenter leur taille d'exclusion moléculaire. De plus, les protéines de mouvement recombinantes, produites et purifiées de *Escherichia coli*, accroissent non seulement la taille d'exclusion moléculaire des pd jusqu'à 20 kDa, mais se déplacent elles-mêmes de cellule en cellule. C'est le cas de la PM de 35 kDa du potyvirus de la mosaïque de la laitue (VML) (Rojas *et al.* 1997). Le fait que la circulation de ces protéines virales fluorescentes puisse être détectée en quelques secondes, indique clairement qu'elles doivent se servir d'un mécanisme endogène pour voyager de cellule en cellule. En effet, l'ADN libéré dans la cellule par bombardement biolistique, produit la PM du virus de la mosaïque du concombre (VMC) fusionnée à la protéine fluorescente verte (PFV) (VMC 3a PM :PFV) *in planta* (Itaya *et al.* 1997). Ces résultats confirment ceux obtenus lors de la microinjection des PM recombinantes mentionnées ci-haut. Les travaux de Morozov (1997) ont démontré que quand la cellule est bombardée par la PM d'un virus en particulier, cette PM aiderait à la propagation d'un autre virus.

Finalement la PM ne facilite pas seulement le déplacement des virus à travers le pd mais aussi le déplacement du complexe ribonucléoprotéique viral. Apparemment, la liaison de la PM du VMT à l'ADN ou l'ARN viral déplie et déroule celui-ci en un fin brin, pour le transporter à travers le pd (Citovsky *et al.* 1992). Le déroulement de l'ADN ou de l'ARN peut être accompli par des protéines cellulaires ou virales mais pourrait aussi être fait par une protéine intégrale du pd lorsque le brin d'acide nucléique passe à travers ce dernier. Tel est le cas pour le complexe ribonucléoprotéique pré-messager qui est déroulé durant le passage à travers les pores nucléaires, lors de l'export nucléaire (Mehlin *et al.* 1992).

Bien que les virus soient des utilisateurs communs de la voie plasmodesmatale, ils ne sont pas les seuls et uniques éléments à emprunter cette voie. Les protéines de défense, les protéines essentielles à la croissance et au développement de la plante ainsi que les facteurs de transcription empruntent aussi l'autoroute plasmodesmatale. La systémine par exemple, qui active la synthèse de l'acide jasmonique, déclenche l'activité de plus de 15 gènes impliqués dans la défense de la plante lors des blessures causées par les herbivores ou les pathogènes (Jacinto *et al.* 1997). Cette protéine de 18 acides aminés voyagerait à travers les pd entre les cellules compagnes et les éléments du tube criblé.

KN1, une protéine végétale endogène codée par le gène *knotted-1* du maïs, non seulement voyage à travers les pd des cellules foliaires, mais augmente la taille d'exclusion moléculaire de ces derniers jusqu'à plus de 20 kDa. De plus, KN1 facilite le trafic de son propre ARNm (Lucas *et al.* 1995).

Mezitt et Lucas (1996) ont démontré la capacité de GLO et DEF, deux autres facteurs de transcription, de voyager à travers les pd. Perbal *et al.* (1996) suggèrent que le trafic de GLO et DEF se fait à travers les pd secondaires connectant la couche L1 et la couche L2 du méristème floral de *Antirrhinum*.

Fonction des plasmodesmes

Il est donc clair que les pd sont perméables à certaines macromolécules mais qu'ils ne le sont pas à d'autres. Cependant, pourquoi une certaine macromolécule, comme GLO, ne pourrait pas traverser toute la plante, du méristème floral aux racines, via les pd? Y aurait-il une régulation du trafic peptidique au niveau du pd? Les pd entre deux cellules en particulier auraient-ils une fonction différente que les pd entre deux autres cellules? Qu'en est-il de certains pd, qui à un âge donné cessent de faire circuler une molécule, à laquelle ils étaient totalement perméables auparavant? La fonction de ces pd changerait-elle à l'intérieur d'un même tissu, selon le niveau de développement qu'atteint la plante?

Plusieurs chercheurs ont prouvé qu'effectivement les pd présents entre différentes cellules et différents tissus ont des fonctions de trafic macromoléculaire différentes. Tel que mentionné plus tôt, dans le tabac transgénique, la PM du VMT (Ding *et al.* 1992) a été localisée dans les pd secondaires entre les cellules de la gaine vasculaire et les cellules parenchymateuses du phloème. Cependant là où la PM du VMT induisait l'augmentation de la taille d'exclusion moléculaire des pd entre les cellules mésophylliennes, elle ne pouvait pas en faire autant pour les pd entre la gaine vasculaire et le parenchyme du phloème.

Un autre exemple est celui du VMC. Le virus est capable de se répliquer et de circuler du mésophylle à la gaine vasculaire dans le tabac transgénique. Il est cependant incapable d'atteindre les cellules du phloème, d'où la résistance de la plante aux infections virales (Anderson *et al.* 1992). Les pd entre la gaine et le parenchyme du phloème semblent posséder une fonction exclusive: non seulement l'accès au phloème y est limité mais la sortie de certains virus du système vasculaire l'est aussi. En effet, les lutéovirus, transmis à la plante par des insectes se nourrissant de phloème, sont confinés au phloème, incapables d'en sortir durant toute la phase d'infection (Ding *et al.* 1992)

Apparemment les pd entre le parenchyme du phloème et les cellules compagnes semblent aussi être uniques. Plusieurs protéines comme la PP1 et la thioredoxine (Jacinto *et al.* 1997), sont produites dans les cellules compagnes et n'accèdent qu'aux éléments du tube criblé. Ces protéines sont absentes du parenchyme du phloème. On soupçonne que ce soient les pd aux bornes de ces dernières qui inhibent, d'une façon encore inconnue, la rentrée des protéines. Finalement, ainsi que l'a démontré Cronin (1995), les pd entre les éléments du tube criblé et les cellules compagnes ont aussi un caractère spécial. Dans ce cas, seulement certaines protéines, ainsi que quelques virus spécifiques, peuvent voyager des cellules compagnes aux éléments du tube criblé.

Grâce à leur fonction de transport, les pd permettent de maintenir une spécificité et une polarité du trafic macromoléculaire. Cependant, quel est le trait du pd, structurel ou biochimique, qui contribue à la régulation des processus physiologiques, à la coordination du développement et des activités métaboliques de la cellule? Toutefois, il ne faut pas oublier que les composantes cytosoliques peuvent contrôler l'interaction entre un pd et une

protéine ou un virus. Les pd entre les mêmes cellules peuvent aussi subir des changements quant à leur fonction et leur structure durant le développement (Ding *et al.* 1992). En effet, bien que la PM du VMT soit produite dans les jeunes feuilles du tabac transgénique, elle est absente des pd primaires de toute la feuille. Elle n'est capable de modifier la taille d'exclusion moléculaire que des pd secondaires des feuilles matures.

Les cotylédons de *C. pepo*

Finalement, en tenant compte de tout ce qui a été mentionné ci- haut, nous avons cherché à isoler, caractériser et séquencer une protéine structurale plasmodesmatale, dans les nervures mineures cotylédonaires, chez *C. pepo*. Le but de notre projet était de répondre à une question fondamentale: quelle est la taille, la nature, la fonction et la séquence des protéines structurales des pd?

Bien qu'il existe peu de recherche à propos de l'anatomie et de la physiologie des cotylédons après germination, nous croyons que le comportement des cotylédons ressemble à une feuille source (Turgeon 1989). Le cotylédon cherche à transloquer ses réserves ainsi que son phloème vers les premières feuilles. Il fonctionnerait donc comme une feuille exportatrice, mettant à profit son système de chargement du phloème.

Il existe deux modèles du chargement du phloème qui expliquent le mouvement des photoassimilats des cellules du mésophylle jusqu'aux cellules des nervures mineures. Les deux modèles impliquent un transport symplastique des sucres, de la cellule du mésophylle jusqu'à la bordure de la cellule compagne, via les pd. C'est à la porte de la cellule compagne que les deux voies de transport se différencient l'une de l'autre. Dans le transport

apoplastique, le sucre atteignant la frontière de la cellule compagne, est déchargé dans l'apoplaste (dans le continuum des parois cellulaires). Sa rentrée dans le complexe "cellule compagne/ élément du tube criblé" est accomplie grâce à des H⁺-ATPases et des symporteurs protéiques de sucrose-proton, travaillant de concert (Beebe et Russin 1999).

Dans le chargement symplastique du phloème, ce qui est le cas pour les feuilles et les cotylédons de *C. pepo* (Turgeon et Beebe 1991), le sucre atteignant la cellule intermédiaire, une forme spécialisée de la cellule compagne, y diffuse via les pd présents à l'interface "cellule de la gaine/ cellule intermédiaire". Ces derniers sont assez larges pour permettre la diffusion du sucrose à l'intérieur de la cellule intermédiaire mais trop étroits pour en faire sortir les sucres synthétisés comme les oligosaccharides du raffinose (Beebe et Russin 1999).

Dans la perspective d'étudier la composition chimique des pd, il nous semblait logique de choisir un matériel riche en pd. Nous avons alors opté pour la paroi cellulaire des cellules des nervures mineures des cotylédons de *C. pepo*. Les cotylédons sont à la jeune plantule ses seules réserves de nourriture ainsi que ses premiers organes photosynthétiques. La clé de survie de la plantule repose sur un acheminement normal des réserves riches en carbone présentes dans les cotylédons, vers la ou les deux premières feuilles. Notre raison d'avoir choisi les cotylédons comme matériel végétal de base repose sur cet acheminement, qui implique la présence de nombreux pd, à l'interface entre les cellules de la gaine vasculaire et les cellules intermédiaires. Dans des travaux antérieurs (résultats présentés seulement sous forme de séminaires), nous avons démontré la présence d'un nombre important de pd dans les parois des cellules des nervures mineures des cotylédons. Durant le premier jour après la germination, nous avons remarqué

que les plasmodesmes à l'interface "cellule de la gaine vasculaire/cellule intermédiaire" sont peu nombreux, sont présents dans les régions non-épaissies de la paroi cellulaire et ne sont pas ramifiés. Ils se classent typiquement comme des pd de type primaire. Cependant, le second jour après la germination la fréquence des pd augmente de façon drastique.

En effet, une particularité frappante des cellules intermédiaires, est la présence de nombreux pd à leur interface avec les cellules de la gaine vasculaire (Beebe et Russin 1999). Les pd à cette interface diffèrent des autres pd par leur structure. Ils sont distribués en gros amas à travers la paroi cellulaire, surtout là où cette dernière s'épaissit. Effectivement, la paroi cellulaire s'altère de façon asymétrique puisqu'à l'interface de la cellule de la gaine et de la cellule intermédiaire, elle s'épaissit du côté de la cellule intermédiaire.

Nous observons aussi que les pd sont extrêmement ramifiés et le sont davantage du côté de la cellule intermédiaire. Les pd jouent un rôle important: ils n'assurent pas seulement la diffusion du sucrose des cellules de la gaine vasculaire vers les cellules intermédiaires, mais empêchent aussi un passage dans le sens contraire. En effet, ils agissent comme un filtre pour arrêter la perte des oligosaccharides du raffinose, nouvellement synthétisés dans la cellule intermédiaire. Cette barrière devient possible grâce au fait que les pd à l'interface "cellules de la gaine/cellules intermédiaires" deviennent plus étroits du côté de la cellule intermédiaire. La limite d'exclusion moléculaire devient alors assez large pour permettre la rentrée du sucrose, mais trop petite pour laisser sortir le raffinose et le stachyose.

Beaucoup de chercheurs travaillent sur le transport symplastique des sucres (Russin et *al.* 1996) dans le but de cerner les types de cellules

impliqués (Beebe et Evert 1992), la fréquence (Fisher 1991, Robinson-Beers et Evert 1991) et la structure des pd empruntés (Russin et Evert 1985), les voies de chargement et de déchargement du phloème (Knoblauch et van Bel 1998), le type de sucre ou de l'alcool glycosylé transporté, ainsi que le mode de croissance des cellules, des pd (Robinson-Beers et Evert 1991), des nervures (Turgeon et Webb 1976, Gagnon et Beebe 1996, Dannenhoffer et Evert 1994) ou du tissu en question. Dans cette optique, des anticorps générés contre certaines protéines extraites de la paroi cellulaire des nervures mineures de cotylédons ont permis de distinguer au MET les pd des nervures mineures des cotylédons de *C. pepo*, surtout à l'interface "cellule de la gaine vasculaire/cellule intermédiaire". Notre objectif dès lors fût de les isoler, de les caractériser biochimiquement et d'en séquencer les composantes. Pour ce faire, nous avons mené des tests qui nous ont amenés à pointer vers une protéine de 38 kDa, que nous avons finalement séquencée.

Ce mémoire trace le cheminement suivi et les résultats obtenus pour aboutir au tableau final de mon projet de maîtrise: la séquence d'une protéine plasmodesmatale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les semences de *C. pepo* L. Melopepo cv. Torticolis (courge) provenant de Burpee Seed Co. (Warminster, Penn., USA) sont cultivées dans les chambres de croissance sous les conditions déjà décrites (Turgeon et Webb, 1973) avec une photopériode de 18 heures et à des températures de 23°C le jour et de 18°C la nuit. Ces plants sont utilisés pour la récolte de cotylédons âgés de dix jours, le premier jour étant l'émergence. Les cotylédons sont coupés au niveau du pétiole. Les plus grosses nervures sont éliminées et le reste du tissu est immédiatement plongé dans une solution d'inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, BA et pAB, 5 mM CA et 500 mM leupeptine). Ceci permet d'éviter la dégradation des protéines par les protéases (fig. 2, p. 18).

Sous la loupe binoculaire, l'épiderme supérieur et inférieur des cotylédons est délicatement enlevé par de légers frottements, à l'aide d'un papier sablé (Very Fine 220 Grit. Norton, Ont.). Les cotylédons ainsi dénudés sont ensuite incubés à 30°C, avec légère agitation, dans une solution de 1.25% pectinase. La pectinase a pour rôle de digérer la pectine présente dans la lamelle moyenne des cellules du mésophylle et, par le même fait, libérer le réseau de nervures mineures des tissus environnants. Pour maximiser cette obtention des nervures de *C. pepo*, après digestion, les cotylédons sont battus très brièvement (trois secondes) en présence de 10 g de billes de verre (150 à 200 μ m). Il est préférable de battre 10 cotylédons à la fois dans 100 ml de tampon. Les nervures sont ensuite recueillies sur une toile de Nylon par décantation et resuspendues dans un tampon de sonification (100 mM Tris, 100 mM KCl, 10% glycérol, 10 mM EDTA et 5 mM DTT ; pH 8.0), enrichis des mêmes inhibiteurs de protéases. Finalement, par une série de sonifications (sonificateur Branson 250 Tip, CT) et de centrifugations (trois minutes à 17320 \times g), les cellules des nervures mineures sont éclatées. Leur protoplaste est recueilli dans le surnageant et est jeté. Les parois cellulaires quant à elles, tombent au fond et sont conservées. À mesure que le culot est purifié, il perd sa couleur verdâtre et devient de plus en plus blanc. Lorsque l'état de la pureté voulue est atteint, le matériel végétal est conservé à -80°C jusqu'à son utilisation. La figure 3 représente l'état de notre matériel végétal obtenu et observé au MET après tant de cycles de purification.

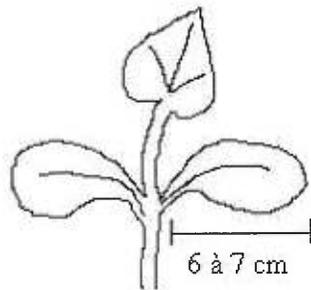
Extraction des protéines

Extraction régulière

Les protéines associées aux parois cellulaires des nervures mineures conservées à -80°C sont extraites de différentes façons pour différentes

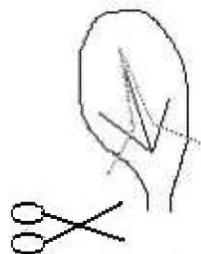
analyses. Par contre, avant chacune des extractions, le matériel végétal est lentement décongelé dans un bain d'eau glacée pour prévenir la décomposition des protéines. Les extractions se font avec de l'eau, du SDS (pur ou présent dans le «Laemmli SB » 2x (4%), Sigma, St. Louis, MO), du Tween 20, du Triton X-100, du CHAPS ou du CaCl₂. Les protéines sont donc

Figure 2: Préparation du matériel végétal.



Plantule âgée de 7 jours

Couper et garder les cotylédons



Ôter les veines majeures

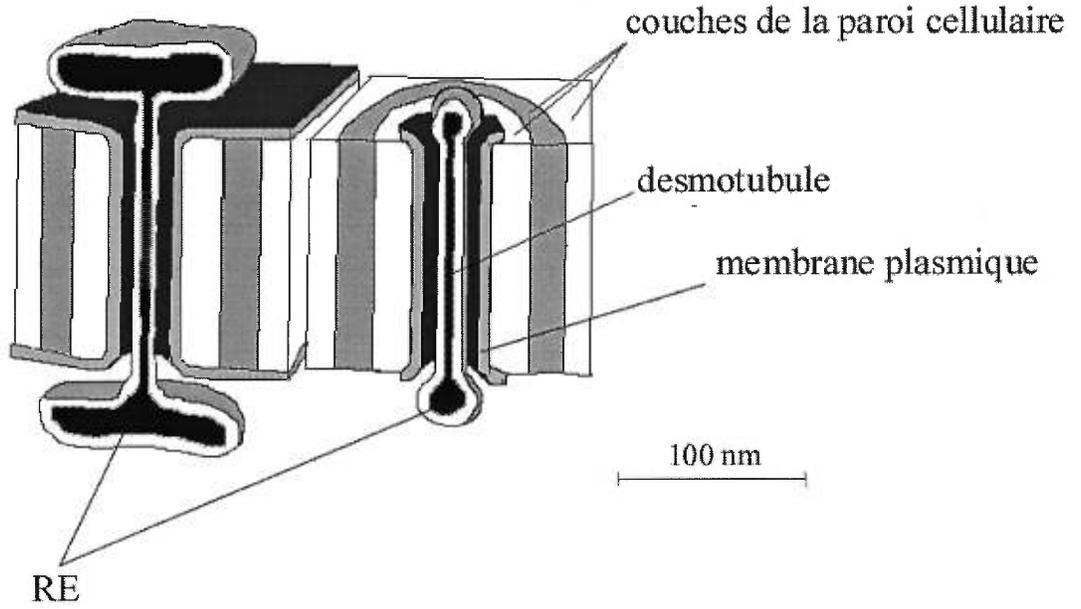
1. Sabler l'épiderme supérieur, ensuite l'inférieur.
2. Incuber les cotylédons dans une solution de pectinase.
3. Battre les cotylédons dans le batteur à billes.
4. Incuber le réseau de veines mineures dans une solution d'inhibiteurs de protéases.

Sonifier, centrifuger et resuspendre, jusqu'à l'obtention d'un culot blanc (composé de parois cellulaires) et d'un surnageant clair (dépourvu du protoplaste cellulaire).

Figure 3: États de la paroi cellulaire (adapté de Turner *et al.* 1994). **A:** État de la paroi cellulaire *in vivo*. **B:** État de la paroi cellulaire observé au MET. Le pd est alors incrusté dans la paroi cellulaire. Il est tapissé d'un simple tube de membrane plasmique et traversé par le desmotubule. Quelques vestiges de la membrane, qui reliaient le pd au protoplaste de la cellule intacte, restent pendants de chaque côté. RE: réticulum endoplasmique.

A: *In vivo*

B: Matériel végétal



extraites des parois cellulaires à l'aide d'un ou d'une suite de plusieurs de ces agents extracteurs. Les concentrations auxquelles ces derniers sont utilisés varient. Le matériel végétal est mis en présence de quatre fois son volume en agent extracteur. Lorsque le matériel végétal est extrait avec le SB, il est bouilli pendant trois minutes. Cependant, lorsqu'il est extrait avec l'eau, le SDS (pur), le Tween 20, le Triton X-100, le CHAPS ou le CaCl_2 , il est non pas bouilli mais incubé en présence de l'agent extracteur, à 4°C, durant un temps donné, avec légère agitation. Après l'extraction, le matériel est centrifugé pendant trois à six minutes, à 4°C ($17320 \times g$, Hermle-Labortechnik, Allemagne). Le surnageant, contenant les extraits de protéines et l'agent extracteur, est récupéré et les protéines sont précipitées à l'acétone froide (-20°C), en étant centrifugé pendant 30 minutes à 4°C. Le mince culot formé est alors resuspendu dans le SB 1x, bouilli pendant trois minutes et chargé sur gel de polyacrylamide.

Extraction en série

Ce qui est appelé extraction en série découle du même principe que l'extraction normale des protéines. Pour l'extraction en série par contre, le même échantillon de matériel végétal est soumis à l'action de deux ou plusieurs agents extracteurs, l'un à la suite de l'autre. L'ordre des agents extracteurs auquel le matériel végétal est soumis, est le suivant: l'eau, suivie de CaCl_2 0.2 M. Ensuite le culot peut être divisé en deux. Alors qu'une moitié est extraite au CHAPS 2%, l'autre moitié est extraite au Triton X-100 2%. Le culot des deux moitiés est finalement extrait au SB 1x (fig. 4, p. 24). Quand le culot n'est pas divisé en deux après l'extraction au CaCl_2 0.2 M, il est impérativement extrait avec du CHAPS 2%, suivi de Triton X-100 2%. Le culot est finalement extrait avec du SB 1x (fig. 5, p. 25), comme lorsqu'il est divisé en deux. Ainsi, après chaque extraction, avant de soumettre le matériel végétal au prochain agent extracteur, les protéines extraites avec l'agent

précédant, sont récupérées par précipitation à l'acétone froide, et chargées sur gel de polyacrylamide.

Culture *in vitro*

Culture des plantes axéniques

Toutes les procédures doivent être suivies sous une hotte à flux laminaire (Canadian Cabinets, Ottawa, Ont.). Les instruments doivent souvent être trempés dans l'éthanol 95%, flambés au-dessus d'une flamme et refroidis, avant utilisation. Les solutions sont stérilisées soit dans l'autoclave soit en étant filtrées à travers un filtre de 0.22 µm. Le protocole doit fonctionner sous les conditions les plus stériles.

Les plantes sont cultivées *in vitro* dans le but de produire des plantes dépourvues de toute contamination. Par le fait même, les parois cellulaires de telles plantes sont moins vigoureuses, par conséquent moins résistantes aux enzymes de digestion. Les graines sont désinfectées à l'éthanol 70% en étant brassées pendant une minute, manuellement. L'alcool est vidé de la bouteille et les graines sont lavées avec une solution au chlorox (2.4% chlorox hypochlorite commercial, deux gouttes de Tween 20), pendant 30 minutes tout en étant brassées vivement. Le chlorox est jeté. Les graines sont lavées trois fois dans de l'eau stérile, cinq minutes chaque lavage. Les graines sont débarrassées de leurs téguments sous la loupe binoculaire à la pince et au scalpel stériles. Deux graines sont placées dans chacune des boîtes Magenta contenant 50 ml de milieu MS stérile (4.3 g de milieu Murashige et Skoog avec les éléments organiques minimaux de Sigma, dans deux litres d'eau, 1 ml de vitamines MS 1000x, 30 g de sucrose, 7 g d'agar; pH 5.7).

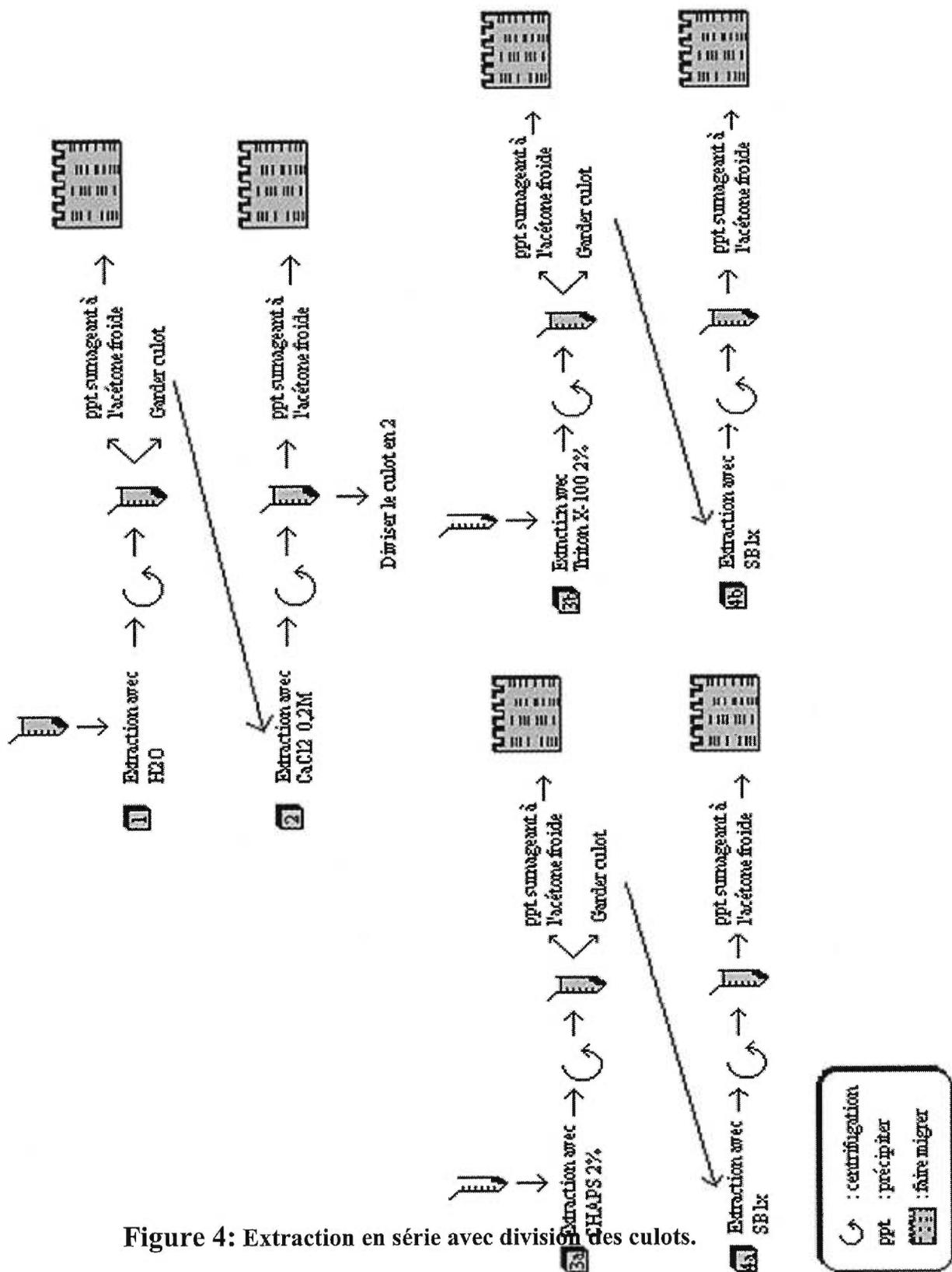


Figure 4: Extraction en série avec division des culots.

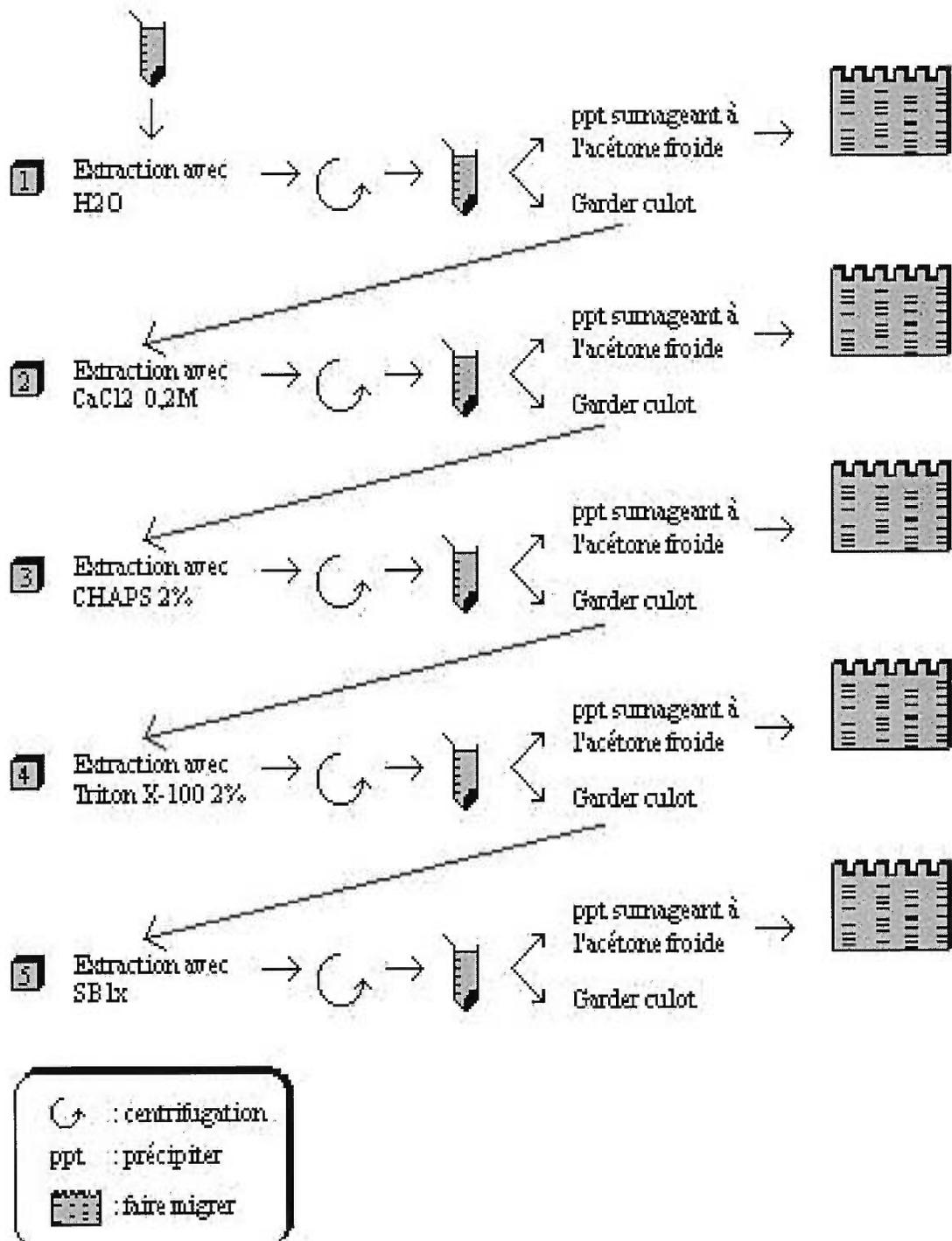


Figure 5: Extraction en série sans division des culots.

Digestion immobile et technique de flottaison

Dix jours plus tard, quand les cotylédons ont atteint un diamètre de près de deux centimètres, ils sont récoltés. Ils sont placés, face abaxiale légèrement sablée, en contact avec le liquide enzymatique (2% cellulase de *Trichoderma reesei*, 6.6 unités/mg de Sigma, 0.5% pectinase de *Aspergillus niger*, 0.2 unités/mg de Amersham, Ohio, 10 mM CaCl₂.2H₂O, 0.7 mM KH₂PO₄, 0.7 mM mannitol; pH 5.6). La digestion ayant pour but de digérer les parois cellulaires et d'en libérer les protoplastes, se poursuit durant toute la nuit dans une immobilité totale et à température ambiante. Le lendemain, la solution enzymatique est doucement pipetée hors de la boîte de Pétri. Elle est remplacée par une solution dense de 0.7 M sucrose, laquelle est vidée goutte par goutte au-dessus des cotylédons. Les gouttes tombent lourdement de haut et font relâcher les protoplastes concentrés sous les cotylédons. Après une petite agitation, la suspension est prélevée à la pipette en évitant de pipetter les gros débris de cotylédons digérés. Elle est transférée dans un tube à centrifugation. Les tubes sont laissés à température ambiante, parfaitement immobiles, ce qui permet la migration des protoplastes moins denses que la solution de sucrose, vers la surface. Les débris retombent au fond. Vu que les protoplastes s'accumulent au fur et à mesure, une mince couche de milieu de culture est déposée à la surface du tube. Le milieu de culture utilisé est le milieu Gamborg : solution minérale B5 (Sigma), 1% sucrose, 0.5% glucose, 0.6 M mannitol, 0.5 mg/l 6-benzylaminopurine, 0.5 mg/l acide acétique naphthalène, 1 mg/l 2,4-acide dichlorophenoxyacétique, les composés organiques de base (100 mg/l myo-inositol, 10 mg/l HCl-thiamine, 1 mg/l acide nicotinique, 1 mg/l HCl-pyridoxine); pH 5.6.

Culture des protoplastes

Quatre heures plus tard, la zone à protoplastes est délicatement prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur. Les protoplastes sont incubés à 27°C,

dans le milieu Gamborg, à l'obscurité. La solution est faiblement agitée. Après une dizaine de jours, les protoplastes sont centrifugés à 2000 rpm (centrifugeuse clinique, International Equipment Co., Needham, MA.) et resuspendus dans le tampon de sonification. Les parois cellulaires sont obtenues de la même manière qu'elles le sont à partir du matériel végétal.

Séparation de phase au Triton X-114

À 0°C, le Triton X-114, un détergent nonionique, forme une solution aqueuse homogène (Bordier, 1981). Cependant, à des températures de plus de 20°C, il se sépare en deux phases: la phase de détergent et la phase aqueuse. Après les avoir extraites au 2% Triton X-100 pendant deux heures à 4°C, et précipitées, les protéines sont resuspendues dans 200 µl de solution salée (10 mM Tris-HCl; pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-114) et incubées à 0°C. La solution formée, claire et transparente, est déposée au-dessus de 300 µl d'une solution de sucrose (6% sucrose, 10 mM Tris-HCl; pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.06% Triton X-114). Le tube contenant les deux solutions superposées est incubé pendant trois minutes à 30°C. Il est ensuite centrifugé (centrifugeuse clinique) pendant trois minutes à température ambiante. Trois phases sont obtenues, énumérées du fond du tube à la surface: une gouttelette de détergent, la solution de sucrose et la solution aqueuse.

La solution aqueuse est pipetée hors du tube et reçoit à nouveau du Triton X-114. La gouttelette de détergent est gardée. Après la dissolution du détergent dans la solution aqueuse, à 0°C, le mélange est redéposé au-dessus de la couche de sucrose précédemment utilisée, est recondensé pendant trois minutes à 30°C et centrifugé. La deuxième gouttelette de détergent est aussi gardée et est combinée à la première. La phase aqueuse obtenue par cette deuxième séparation est la phase finale. Elle est rincée dans du Triton X-114

2%, mais le détergent n'est pas gardé dans ce rinçage. Deux phases sont finalement obtenues: la phase aqueuse (AQ) et la phase de détergent (DET) qui contiennent respectivement les protéines hydrophiles et les protéines hydrophobes. Les protéines contenues dans chacune des deux phases sont précipitées à l'acétone froide, resuspendues dans le SB 1x et séparées sur gel de polyacrylamide.

Colorations au nitrate d'argent et au Bleu de Coomassie

Suivant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le gel est rincé quelques heures dans du méthanol 50% (Wray, Boulikas et Hancock, 1981). Il est ensuite coloré dans une solution de nitrate d'argent (0.8% AgNO_3 , 0.2 M NH_4OH) pendant 15 minutes. Le gel est lavé dans de l'eau pendant un autre 15 minutes. En lavant le gel plusieurs fois, le nitrate d'argent et l'hydroxyde d'ammonium sont mieux éliminés. Les bandes peptidiques apparaissent en quelques minutes lorsque le gel est trempé dans une solution d'acide citrique (0.005% acide citrique, 0.02% formaldéhyde 37%). Lorsque le gel atteint la coloration désirée, il est rincé dans une solution de 5% acide acétique, pendant 15 minutes, pour arrêter la couleur de se développer davantage. Pour mettre le gel en archives, ce dernier peut être lavé et hydraté dans une solution de 3% glycérol et séché entre deux feuilles de cellulose (Promega, Madison, WI, USA).

Toujours après l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, et pour des analyses plus rapides, le gel peut être coloré au Bleu de Coomassie R-250 pendant 15 minutes (0.125% Bleu de Coomassie, 50% méthanol, 10% acide acétique). La coloration est cependant peu sensible à la détection de bandes peptidiques faiblement présentes.

Electrophorèse et transferts de type Western

Les extraits de protéines sont chargés sur le gel de SDS-polyacrylamide, 10 ou 12.5%. L'électrophorèse et le transfert de type Western sur membrane de nitrocellulose ont été effectués selon les directives du fournisseur de la chambre d'électrophorèse et de transfert (Mini-Protein II, Bio-Rad, Mississauga, Ont.).

Identification des protéines des parois cellulaires

Après le transfert, les membranes sont brièvement rincées dans du TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20) et ensuite bloquées pendant 30 à 60 minutes dans une solution de TBST et de lait 5% écrémé en poudre. Les membranes sont ensuite incubées (pendant une heure à 27°C) avec l'anticorps primaire (sérum immun de lapin dirigé contre les protéines des parois cellulaires des nervures mineures de *C. pepo*) dilué à 1/5000, dans le TBST et le 5% lait écrémé. Après l'incubation, les membranes sont lavées trois fois, dix minutes chaque lavage dans le TBST et le lait, et incubées avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-lapin) dilué à 1/7500 dans le TBST et le 5% lait écrémé. Les membranes de nitrocellulose sont finalement lavées deux fois dans le TBST et le lait 5% et une fois dans TBST, cinq minutes pour chaque lavage. Les substrats de la phosphatase alcaline sont ajoutés («Western Blue Substrate», Promega, Madison, WI.). Les bandes peptidiques se développent doucement et deviennent visibles après quelques minutes.

Identification des protéines glycosylées versus les protéines non-glycosylées

Le protocole d'identification des protéines glycosylées versus les protéines non-glycosylées a été suivi selon les directives du fournisseur de la

trousse d'immunodétection (DIG Glycan/Protein Double Labeling Kit, Boehringer Mannheim, Laval, Qc.). La détection des protéines et celle des glycoprotéines se fait directement après que celles-ci aient été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Lorsque l'expérience est achevée, les bandes de glycoprotéines sont reconnaissables grâce à leur couleur rose, tandis que les bandes de protéines non glycosylées sont différenciées des dernières par leur couleur bleue.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Procédés de solubilisation de la membrane

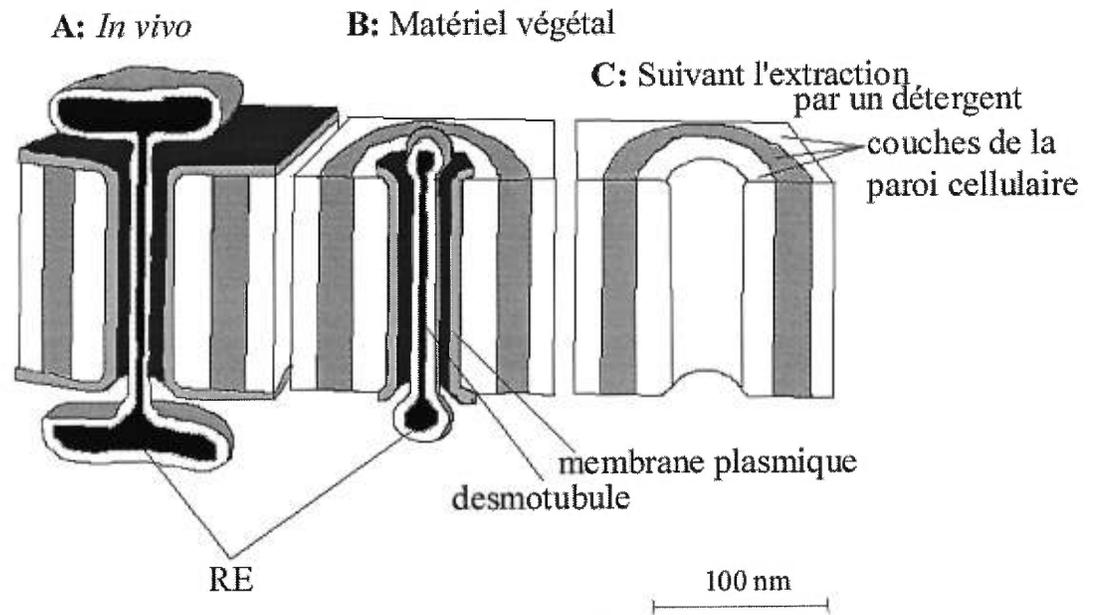
Avant d'aller plus loin, je dois expliquer pourquoi nous utilisons les détergents comme le SDS, le Triton X-100, le CHAPS ainsi que les sels, comme le CaCl_2 , tout le long de nos procédés expérimentaux.

Les détergents

Le rôle primaire des détergents dans la purification des protéines intégrales membranaires, est de solubiliser la membrane en décomposant la bicouche lipidique, et de se lier aux composantes protéiques de la membrane pour former des micelles mixtes de détergent et de protéines intégrales

Figure 6: États de la paroi cellulaire (suite) (adapté de Turner *et al.* 1994).

A: État de la paroi cellulaire *in vivo*. **B:** État de la paroi cellulaire observé au MET. Le pd est alors incrusté dans la paroi cellulaire. Il est tapissé d'un simple tube de membrane plasmique et traversé par le desmotubule. Quelques vestiges de la membrane, qui reliaient le pd au protoplaste de la cellule intacte, restent pendants de chaque côté. **C:** État hypothétique de la paroi cellulaire suivant le traitement avec un détergent solubilisateur de membrane. Le desmotubule et la membrane plasmique sont alors extraits de la paroi cellulaire. RE: réticulum endoplasmique.



membranaires (Collins et Salton 1979). La figure 6 représente l'état de la paroi cellulaire, dépourvue du desmotubule et du tapis de membrane plasmique, suivant l'action d'un détergent solubilisateur de membrane.

Nous savons par contre que ce n'est pas là leur seul rôle. Les détergents sont aussi utilisés comme agents désagrégateurs et comme aides à la reconstitution ou la recristallisation des protéines membranaires par exemple. Ils se distinguent par leur structure amphiphilique: chaque molécule contient une moitié hydrophobe et une moitié hydrophile. De plus, contrairement aux lipides polaires, les détergents forment des micelles, ce qui les rend solubles dans l'eau (Deutscher, 1990). La moitié hydrophobe est formée d'hydrocarbures ou de stéroïdes, formant la plupart du temps des chaînes (ou des queues) droites mais parfois aussi ramifiées. La terminaison hydrophile, ou la tête, est beaucoup plus variée. Elle peut être ionique, non-ionique, zwitterionique, simple ou élaborée. Aussi il semble que la queue confère au détergent son activité biologique et interagit avec les protéines par des interactions hydrophobes. La tête quant à elle, semble être impliquée dans les interactions plus spécifiques comme les liaisons H et le couplage ionique.

Plusieurs paramètres expliquent le comportement des détergents. Ceux qui sont reliés à la solubilisation sont les suivants: la concentration critique de la formation des micelles (cmc), le nombre d'agrégation (N), la température critique de formation des micelles (cmt), le point ou la température de condensation (cp) des détergents non- ioniques et la balance hydrophile-lipophile (HLB). La cmc est la concentration à laquelle les micelles commencent à se former. N, le nombre d'agrégation, représente le nombre de monomères de détergent par micelle. La cmt est la température à laquelle un système "détergent- solvant" passe d'un état cristallin hydraté à une solution

micellaire. En avant dernier lieu, le point de condensation représente aussi une température. C'est la température à laquelle la solution de détergent passe d'un état isotropique micellaire à un système de deux phases (comme dans la section traitant de la séparation de phase par le Triton X-114, ci-dessous). La première phase, flottant au-dessus de l'autre, est dépourvue de détergent tandis que la deuxième phase regorge de micelles géantes. Finalement, le paramètre HLB est celui qui tient compte de l'index d'hydrophilicité. Plus la valeur de la HLB augmente et plus le détergent est hydrophile. Le tableau I résume quelques-unes des propriétés des détergents que j'ai utilisés. La valeur des paramètres qui y est relevée dépend premièrement de la structure des monomères et deuxièmement des conditions expérimentales, comme la température, la pression, le pH et la force ionique.

La principale raison pourquoi nous avons utilisé les détergents cités dans le tableau I, est à cause de leur propriété non-dénaturante. Bien qu'il soit possible que nos protéines aient perdu leurs sites de liaison ou leur activité enzymatique après l'extraction, il est à noter que ces deux mêmes propriétés protéiques peuvent être perdues à cause de multiples raisons, entre autres, la dissociation d'un cofacteur ou d'une sous-unité. Il est difficile de choisir un détergent, et encore plus difficile de décider à quelle concentration l'utiliser. Dans notre cas, le détergent le plus efficace, soit celui qui libérait le plus de protéines et de composantes intégrales membranaires, était le SDS.

Séparation de phase au Triton X-114

En dessous de sa température de solubilisation (cloud point), 0°C, le Triton X-114, détergent non-ionique, forme une solution homogène et devient un solubilisateur efficace des protéines membranaires (Lehninger 1975). Durant sa phase de solubilisation, le Triton X-114 place les molécules lipidiques du détergent en contact avec la protéine ou le domaine hydrophobe

détergent	cmc (mM)	N	autres propriétés	la queue hydrophobe	la tête hydrophile
Triton X-114	0.17	—	HLB: 12.4 cp: 22°C *	p-tert- (Octylphenyl ou Octylphenyl- hexyl)	non- ionique
Triton X-100	0.30	140	HLB: 13.5 cp: 65°C *	p-tert- (Octylphenyl ou Octylphenyl- hexyl)	non- ionique
CHAPS	6.5	10	Charge nette nulle	chaîne de stéroïdes	zwitter- ionique
SDS	8.2	60	HLB: 40 sel, cation, insoluble	C ₁₂	anionique

Tableau I: Tableau de quelques propriétés des détergents utilisés au cours de ce mémoire. (Tiré de Deutscher 1990). cmc: concentration critique des micelles, HLB: balance hydrophile- lipophile, cp: point de condensation, *: cp dans une solution de 1%, —: valeur absente.

des protéines intégrales de la membrane, ce qui mène à la formation de micelles mixtes de protéines amphiphiliques et de détergent. Les protéines hydrophiles quant à elles, régies par leur nature physicochimique, ne forment pas de micelles avec le détergent (Lehninger 1975). À des températures de plus de 20°C par contre, la solution de détergent se sépare en une phase aqueuse et une phase de détergent. C'est la condensation du détergent. Sous de telles conditions, les micelles formées par le détergent et les protéines amphiphiliques se retrouvent dans la phase qu'on appelle phase de détergent alors que les protéines hydrophiles migrent vers la phase aqueuse. Le degré de séparation de ces deux phases augmente avec l'augmentation de la température au dessus de 20°C.

Pour ce qui est du Triton X-100, la formation de micelles est générée à des températures moindres que la température ambiante. La condensation de la solution a lieu et se poursuit à partir de 64°C. Comme il en est du Triton X-114, la séparation devient de plus en plus nette lorsque la température dépasse les 64°C. Dans les séries de Triton X, la température de solubilisation dépend fortement du nombre d'unités hydrophiles d'oxyéthylène condensées dans le résidu hydrophobe d'octylphényle.

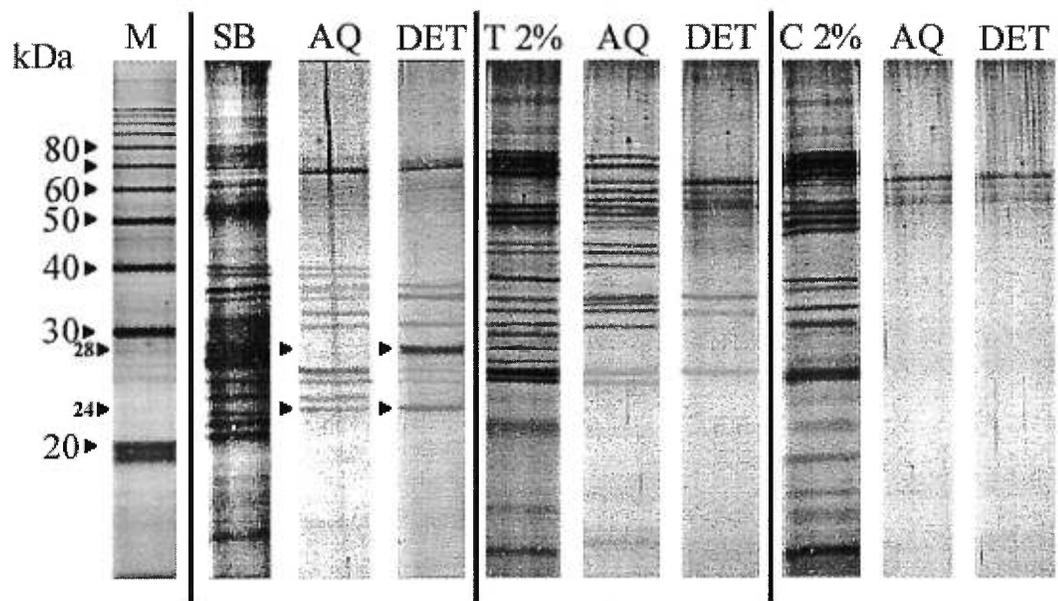
Bordier (1981) a établi le protocole d'expérimentation de la séparation de phase dans le Triton X-114, selon lequel il devient possible de recueillir les protéines hydrophiles de la phase aqueuse et les protéines amphiphiliques intégrales de la membrane dans la phase de détergent. Pour tester un tel protocole, Bordier (1981) l'a appliqué à la séparation de l'albumine de sérum, la catalase, l'ovalbumine, la concavaline A, la myoglobine et le cytochrome c, toutes des protéines hydrophiles, ainsi qu'à la séparation de l'acétylcholinestérase de la membrane de l'érythrocyte humain, la bactériorhodopsine et l'oxydase du cytochrome c de la levure, celles-ci toutes

des protéines amphiphiliques. Non seulement la séparation a eu lieu, mais la récupération des protéines par la suite était excellente.

La même technique a été appliquée aux protéines de la paroi cellulaire des nervures mineures de *C. pepo* selon la méthodologie décrite dans "Matériel et Méthodes". J'ai extrait les protéines avec le SB 1x (fig. 7, p. 39), le Triton X-100 2% et le CHAPS 2%. Cherchant à tirer les protéines hydrophiles des protéines amphiphiliques, la méthode de séparation de phase a été appliquée à chacun des trois extraits. Si l'on combine les protéines obtenues dans la fraction de détergent aux protéines obtenues dans la fraction aqueuse, il est clair que l'on n'obtienne pas la totalité des protéines dans l'extrait de départ, soit l'extrait au SB 1x, au Triton X-100 2% ou au CHAPS 2%. Donc, la récupération des protéines à partir des deux phases ne se fait pas avec un rendement de 100%. Par exemple, la protéine de 28 kDa est extraite plus faiblement dans la fraction de détergent que dans la fraction de SB 1x. De plus, on peut voir que plusieurs protéines ne sont pas exclusives à l'une ou à l'autre des fractions, comme la protéine de 24 kDa, qui est extraite avec le SB 1x, et qui se retrouve dans les deux phases en quantités égales.

Le tableau II, résume la présence des protéines extraites au SB 1x dans la fraction aqueuse et de détergent. Ce sont celles de 24 à 28 kDa, de 32 et 33 kDa et de 36 à 39 kDa, inclusivement. Les protéines de 24 et de 32 kDa se retrouvent en quantités presque égales dans les deux fractions. Les bandes de 25, 33, 38 et 39 kDa sont recueillies dans la phase aqueuse exclusivement. La phase de détergent ne possède que l'exclusivité de la protéine de 28 kDa. Trois autres bandes se sont retrouvées fortement dans la phase aqueuse et que très faiblement dans la phase de détergent. Ce sont les bandes ayant migré à 26, 27 et 37 kDa. La protéine de 36 kDa quant à elle, unique dans son comportement,

Figure 7: Séparation au Triton X-114 des protéines préalablement extraites au SB, au Triton X-100 ou au CHAPS, en phases aqueuse et détergent. SB: protéines de 125 μ l de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, T 2%: protéines de 250 μ l de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du Triton X-100 2%, C 2%: protéines de 250 μ l de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du CHAPS 2%, AQ: protéines hydrophiles de la phase aqueuse, après l'extraction au SB 1x, au Triton X-100 2% ou au CHAPS 2%, DET: protéines hydrophobes de la phase de détergent, après l'extraction au SB 1x, au Triton X-100 2% ou au CHAPS 2%, M: marqueur protéique, GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.



GEL 12%

Prot. Présente seulement dans AQ	Prot. présente seulement dans DET	Prot. présente un peu dans AQ et un peu dans DET	Prot. présente un peu dans AQ et beaucoup dans DET	Prot. présente beaucoup dans AQ et un peu dans DET
25, 33, 38, 39 kDa	28 kDa	24, 32 kDa	36 kDa	26, 27, 37 kDa

Tableau II: Classification des protéines extraites au SB 1x, selon leur présence dans la phase aqueuse, la phase de détergent ou dans les deux phases à la fois, conformément à l'expérience de séparation de phase au Triton X-114. Prot.: Protéines, AQ: phase aqueuse, DET: phase de détergent.

se retrouvait en quantités beaucoup plus fortes dans la phase de détergent que dans la phase aqueuse.

Qu'indiquent ces résultats? Des 11 bandes protéiques extraites dans les deux phases, seulement cinq d'entre elles se sont prononcées dans l'une ou l'autre des phases. Selon Bordier (1981), les 11 bandes auraient dû se comporter de la sorte. Nous ne pouvons analyser donc que le comportement de ces cinq bandes, parmi lesquelles quatre sont hydrophiles et seulement une est amphiphilique.

D'après nos hypothèses, les protéines plasmodesmatales sont hydrophiles, du moins majoritairement hydrophiles à cause de leur exposition en permanence au passage macromoléculaire cytoplasmique, d'une cellule à l'autre. Bien que le SB, le Triton X-100 2% et le CHAPS 2% aient extrait les mêmes protéines dans la phase aqueuse et la phase de détergent, nous avons étudié le profil des protéines extraites par le SB car ce dernier a extrait plus de protéines, ce qui nous a permis d'en observer tout simplement plus.

Comme il est montré à la figure 7, nous avons aussi séparé en deux phases les protéines des parois cellulaires initialement extraites au Triton X-100, 2%. Les protéines qui ont été retenues dans la phase aqueuse seulement sont les bandes de 31 et 38 kDa ainsi qu'un doublet vers 75 kDa. Une seule bande était exclusive à la phase de détergent et c'est la bande de 40 kDa. Toutes les autres bandes, c'est-à-dire celles de 25, 26, 34, 35, 36, 42, 43, 45, 49, 53, 57, 60 et 64 kDa se trouvaient communément dans les deux phases mais majoritairement cependant, dans la phase aqueuse.

Une question quant à la précision de la technique de séparation de phase au Triton X-100 se pose: pourquoi certaines bandes se retrouvent-elles à la fois dans la phase aqueuse et dans la phase de détergent? Tout simplement

parce que, comme illustré à la figure 8, il est physiquement impossible de séparer la phase aqueuse de la phase de détergent sans laisser une fine couche de la première sur cette dernière. De plus, il est possible que certaines protéines possèdent à la fois une structure hydrophile et hydrophobe d'où leur présence dans les deux phases.

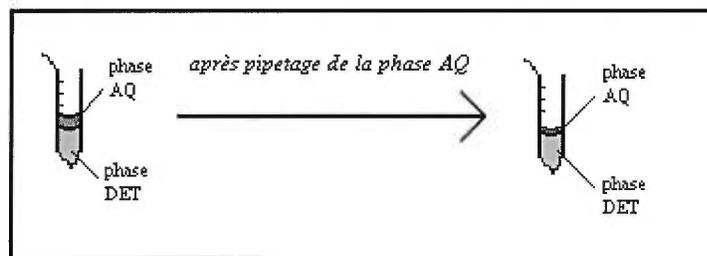


Figure 8: Séparation imprécise des deux phases, effectuée par pipetage, laissant une fine couche de la phase aqueuse au-dessus de la phase de détergent. AQ: phase aqueuse, DET: phase de détergent.

Finalement, bien que la séparation de phase après l'extraction des protéines au CHAPS 2% ne s'est pas avérée intéressante, seulement quatre bandes ont migré dans la phase aqueuse et la phase de détergent: les bandes protéiques de 53, 57, 60 et 64 kDa.

Les protoplastes

La culture des protoplastes se fait souvent dans la perspective de régénérer de nouvelles cellules, de nouveaux tissus ou de nouveaux plants (Renjing *et al.* 1990, Zapota *et al.* 1977, Moreno *et al.* 1984, Roig *et al.* 1986, Biserka et Sibila 1991, Gonsalves *et al.* 1995). D'autres fois, la culture des protoplastes est idéale pour l'isolation des membranes plasmiques dépourvues

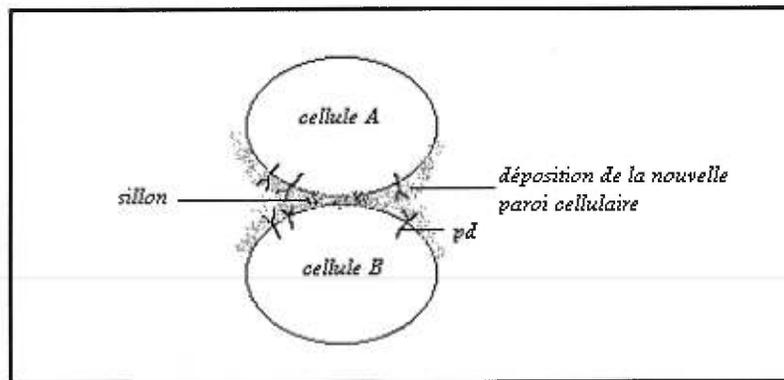
des parois cellulaires (Polenko et Maclachlan 1984). Dans notre cas cependant, nous étions intéressés à la culture des protoplastes, non pas dans la mesure de régénérer un nouvel individu, mais dans la perspective de cultiver des cellules individuelles et complètes dans leur anatomie. Nous voulions générer des cellules avec des parois cellulaires mais sans plasmodesmes, dans le but d'étudier le patron protéique d'une telle paroi cellulaire.

Une nouvelle paroi cellulaire, de laquelle les pd seraient dégradés grâce à des mécanismes expliqués plus tard, serait éventuellement formée quelques jours après la mise en culture des protoplastes provenant des cotylédons de *C. pepo*. En d'autres termes, les protéines structurales des pd seraient absentes puisque les pd eux-mêmes seraient dégradés, voire absents. Dans le cadre de notre projet, une telle expérience nous permettait de remarquer les protéines manquantes d'un extrait de protéines des parois cellulaires des cellules en culture de *C. pepo*. Une telle trouvaille nous aiderait à pointer du doigt une protéine intégrale de pd, révélée par son absence.

Formation des plasmodesmes dans les protoplastes en régénération

Deux particularités des protoplastes en formation sont la distribution ainsi que l'orientation des demi-pd. Ces derniers se trouvent partout dans la fine paroi cellulaire nouvellement formée et sont orientés et exposés au milieu de culture (fig. 9, ci-dessous) (Ehlers et Kollmann 1996). Ces particularités sont le produit de la digestion de la paroi cellulaire pour libérer les protoplastes lors de la mise en culture. En effet, suivant la digestion de la paroi cellulaire et selon les études qui ont été faites avec les protoplastes de *Vicia faba* (Ehlers *et al.* 1996) ainsi que les protoplastes de *Solanum nigrum* (Ehlers et Kollmann 1996), la présence de ces moitiés de pd est sûrement un moyen pour le protoplaste en régénération de regagner la communication avec

sa cellule voisine. Cependant, la plupart de ces pd discontinus disparaissent un peu plus tard durant le développement des protoplastes. Les seuls qui restent intacts sont ceux situés près de la périphérie de la zone de division ou ceux près de la zone de contact avec la cellule voisine; les autres sont dégradés. Ehlers *et al.* (1996) ont prouvé que les pd qui sont dégradés réagissent fortement aux anticorps de l'ubiquitine. L'ubiquitination de ces pd serait le signal et le mécanisme nécessaire à leur dégradation comme il l'est pour plusieurs protéines dans le noyau (Peters *et al.* 1994). Bref, il ne resterait donc dans la paroi cellulaire que quelques plasmodesmes: ceux situés dans le sillon



résultant par deux cellules se rapprochant l'une de l'autre (fig. 9, ci-dessous) et ceux formés dans la plaque cellulaire après division.

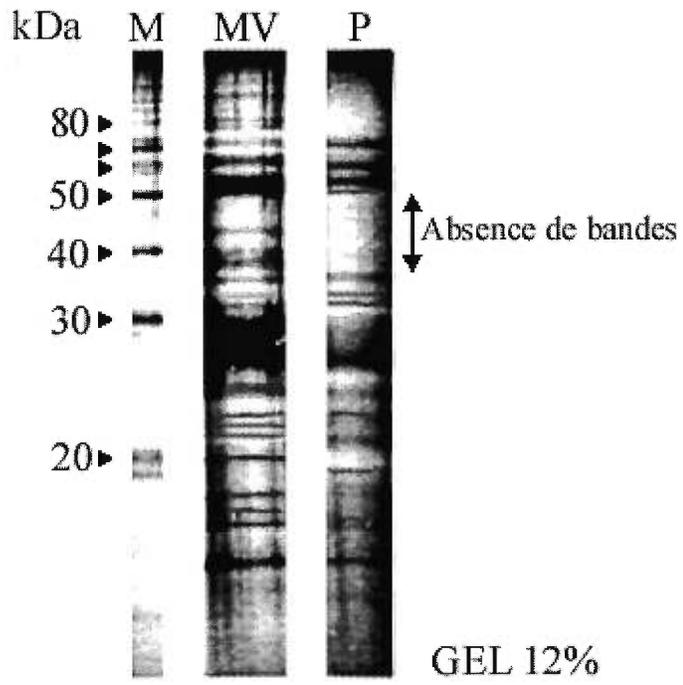
Figure 9: Présence de pd ramifiés discontinus dans la fine et nouvelle paroi cellulaire, dans les sillons formés par deux cellules en fusion.

Les pd discontinus situés dans le sillon semblent s'y trouver dans le but de rejoindre les pd discontinus de la cellule adjacente. Les demis- pd se rejoignent et forment alors des pd ramifiés complets et fonctionnels entre deux cellules voisines. Les pd discontinus qui ne réussissent pas à joindre leur semblable dans la cellule adjacente sont dégradés par la cellule, aussi par

ubiquitination. Les deux seules raisons qui semblent promouvoir la présence de pd dans des protoplastes en régénération sont donc le rapprochement de deux cellules et la promotion des divisions cellulaires.

Dans notre laboratoire, nous avons eu raison de croire que si l'on créait un environnement qui n'avantagerait ni le rapprochement cellulaire ni la division mitotique, nous pouvions créer une cellule dépourvue de plasmodesmes ou du moins, une cellule comportant un nombre infiniment petit de pd. Pour défavoriser le rapprochement cellulaire, nous gardions nos cultures en état de brassage léger mais constant. Ceci empêchait les cellules de précipiter dans le fond de l'erlenmeyer et/ou de rentrer en contact suffisamment intime pour commencer à joindre ensemble leurs pd. De plus, en maintenant des concentrations faibles en auxine, nous prévenions la division cellulaire. L'inhibition de la division cellulaire se traduisait en une absence de pd qui se seraient formés par la plaque cellulaire de deux cellules en division. Dans les travaux de Ehlers *et al.* (1996), la majorité des pd avaient disparu après neuf jours de culture. Nous avons donc fixé la récolte des parois cellulaires, théoriquement dépourvues de pd, à dix jours de mise en culture des protoplastes. Nous avons extrait les protéines de la paroi cellulaire de cellules âgées de dix jours, que nous avons ensuite séparées par SDS-PAGE. La figure 10 représente le patron obtenu sur gel d'acrylamide, comparé à une extraction régulière de protéines des parois cellulaires de nervures mineures de *C. pepo*. La première chose que nous remarquons de force est l'absence totale de bandes entre 37 et 50 kDa, soient les bandes à 37, 38, 39, 43, 48 et 50 kDa. Ces protéines étant absentes de l'extrait protéique provenant des parois cellulaires des pd, elles deviennent candidates au titre de protéines plasmodesmatales, à l'exception de la bande de 48 kDa (explications ci-bas).

Figure 10: Extraction des protéines des parois cellulaires des protoplastes de *C. pepo*. MV: protéines de 500 μ l de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, P: protéines extraites des parois cellulaires des protoplastes en culture de *C. pepo*, M: marqueur protéique, GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.



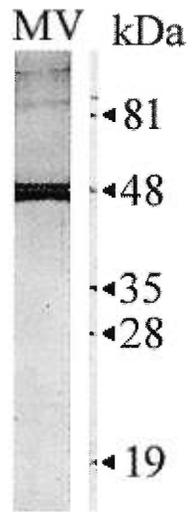
Les contaminants protéiques du matériel végétal

En effet, la protéine de 48 kDa, même si présente dans l'extrait "MV" et absente dans l'extrait "P" (fig.11, p. 50), n'est pas une protéine plasmodesmatale. La bande de 48 kDa n'est nulle autre que la grande sous-unité de la rubisco, qui contamine souvent notre matériel végétal et dont il est difficile, voire impossible, de se débarrasser totalement. En effet, quel que soit le degré de pureté que nous atteignons, il reste toujours quelques contaminants cytoplasmiques. La figure 11A démontre la présence de la grande sous-unité de la rubisco. Nous l'avons détectée grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines des parois cellulaires, piégées sur membrane de nitrocellulose, grâce à un transfert de type Western. D'autres contaminants sont présents dans notre matériel végétal. La figure 11B représente ces contaminants, qui sont les protéines du phloème, la PP1 (26 kDa) et la PP2 (96 kDa), ainsi que les deux sous-unités de la rubisco (20 et 48 kDa). Ces quatre protéines sont très abondantes dans le phloème, d'où nous les avons tirées, en coupant le pétiole du cotylédon, duquel s'écoule une riche sève. La rubisco n'est normalement pas une protéine du phloème. En coupant net cependant à travers le pétiole, nous avons dû briser quelques protoplastes dont s'est échappée la rubisco. Par conséquent, nous l'avons tirée et détectée dans notre extrait de phloème.

Nous avons récupéré la sève à la pipette, et en avons extrait les protéines, que nous avons séparées sur gel d'acrylamide (trace PP, fig. 11B p. 50). Les épaisses bandes noires, à 26 et 96 kDa, marquent respectivement la PP1 et la PP2. Les deux sont assez détectables dans notre matériel végétal (trace "MV", fig. 11B, p. 50), surtout la PP1. Bien que la petite sous-unité de la rubisco soit faiblement présente, la grande sous-unité quant à elle l'est largement.

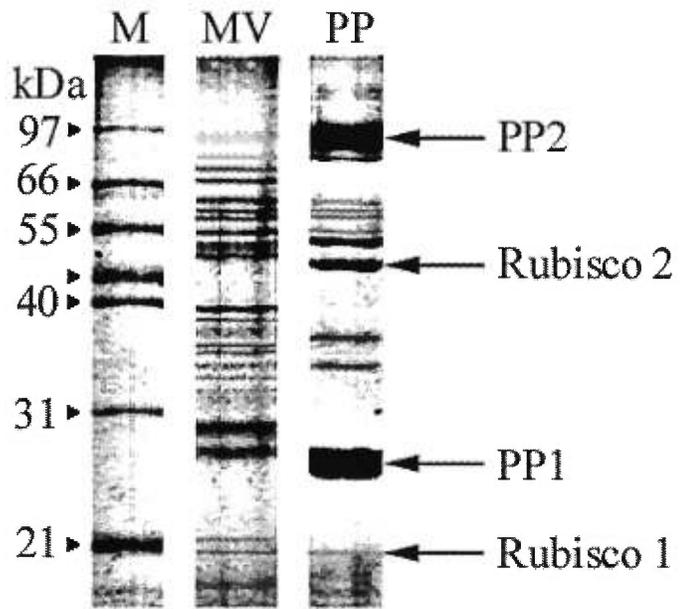
Figure 11: A: Test de détection de la Rubisco. Présence de la grande sous-unité de la Rubisco à 48 kDa, dans notre matériel végétal, révélée par immunodétection après un transfert de type Western, sur membrane de nitrocellulose, des protéines des veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites au SB 1x. **B: Les protéines de l'exudat du phloème de *C. pepo*.** M: marqueur protéique, MV: protéines de 500 µl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, PP: protéines du phloème (PP1 et PP2), protéines de 50 µl de l'exudat de phloème tiré à la base du pétiole d'un cotylédon de *C. pepo*, Rubisco 1: petite sous- unité de la rubisco, Rubisco 2: grande sous- unité de la rubisco, GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.

A



membrane de
nitrocellulose

B



GEL 12%

La protéine de 38 kDa

Après avoir mené les expériences de séparation de phase au Triton X-114, cultivé des protoplastes et extrait leur paroi cellulaire, notre intérêt s'est posé sur la protéine de 38 kDa. Nous avons observé que cette bande peptidique était absente du patron protéique sur gel, provenant des parois cellulaires des protoplastes. L'absence de cette bande portait à la supposer comme étant une protéine plasmodesmatale. De plus, cette protéine est la seule qui s'est constamment retrouvée dans la phase aqueuse. Elle s'est avérée être de nature hydrophile, puisqu'elle a migré vers la phase aqueuse lorsqu'elle était extraite au SB 1x (tableau 1, p. 36) ainsi que lorsqu'elle était extraite au Triton X-100. Par conséquent, même quand la protéine de 38 kDa a été extraite avec deux détergents différents, elle s'est tout de même comportée de la même façon.

Ayant donc une candidate en main, il nous fallait en connaître un peu plus sur sa nature biochimique. Nous avons alors cherché à savoir si elle était glycosylée ou pas, si elle était extraite par les sels comme le CaCl_2 , si elle était présente dans un très jeune cotylédon, par quel détergent elle serait le mieux extraite et en quelles quantités microscopiques se ramassait-elle dans nos gels de polyacrylamide. Pour ce faire, nous avons mené des tests de glycosylation, des extractions au CaCl_2 , des extractions des protéines des parois cellulaires des nervures mineures de très jeunes cotylédons, des extractions en série ainsi que des extractions en présence d'échantillons d'ovalbumine pour estimer les infimes quantités protéiques extraites.

Test de glycosylation

Il existe deux raisons pour lesquelles nous avons tenté d'identifier les glycoprotéines dans notre matériel végétal. La première raison vise les problèmes d'immunologie: nous cherchions à savoir si nos anticorps polyclonaux possédaient réellement une spécificité de reconnaissance face à nos protéines ou si tout simplement ils ne reconnaissaient que le groupement de sucre. Dans le dernier cas, nous aurions eu un problème. En effet, des anticorps qui semblent reconnaître des protéines sur une membrane de nitrocellulose ne fournissent pas une vraie réponse s'ils ne reviennent qu'à s'attacher au groupement glycosylé de la protéine en question. En d'autres termes, dans un tel cas, il n'existe pas de complémentarité "acides aminés-acides aminés" entre la protéine et l'anticorps.

En outre, la deuxième raison pour laquelle nous avons mené des tests de glycosylation est pour nous assurer que la protéine de 38 kDa n'est pas une glycoprotéine. Pourquoi? Au cas où nous aurions voulu isoler un des anticorps polyclonaux qui serait bien sûr spécifique à cette protéine, il aurait fallu que nous sachions que l'anticorps en question ne reconnaissait pas les chaînes de sucre mais bien les acides aminés de la protéine de 38 kDa. Si nous avons décidé de diriger l'anticorps, une fois isolé, contre une glycoprotéine, *in vivo* ou *in vitro*, il aurait été impossible de le faire si la protéine avait perdu son groupement de sucre. De plus, les protéines glycosylées existent en grand nombre. Un anticorps spécifique à une chaîne de carbone agirait de façon non-spécifique, puisqu'il reconnaîtrait n'importe quelle protéine portant le groupement de sucre en question.

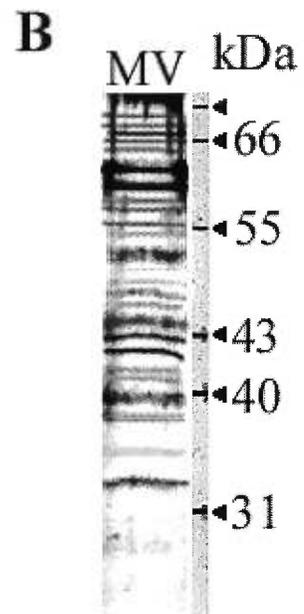
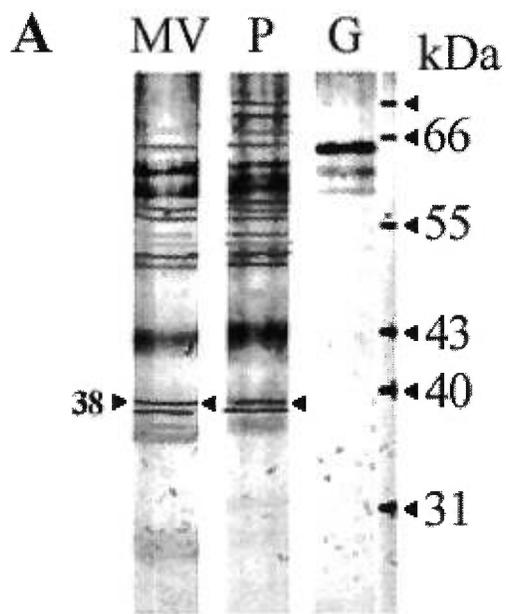
Avant d'aller plus loin donc, posons la question suivante: la protéine de 38 kDa, une glycoprotéine ou pas? Nous avons séparé nos protéines par

SDS- PAGE et les avons transférées par un transfert de type Western, sur une membrane de nitrocellulose. À partir de ce point de départ, nous pouvons procéder à la détection des glycoprotéines. Chacun des trois puits a été traité séparément par des anticorps différents. Suivant les instructions d'une trousse de Boehringer Mannheim, nous avons oxydé le groupement hydroxyle du sucre en aldéhyde. Ensuite, l'aldéhyde créé a été marqué par couplage covalent avec du DIG- hydrazide. Ce dernier est reconnu par l'anti- digoxigénine- POD qui, au contact avec le substrat (Teton POD), cause un précipité bleu.

Le patron obtenu est représenté au premier puits à la figure 12A, trace "G". Les bandes glycosylées sont au nombre de trois et sont situées à environ 60, 63 et 65 kDa. La protéine de 38 kDa n'est donc pas glycosylée puisqu'elle n'apparaît pas dans la trace "G". Le deuxième puits représente la trace "MV" qui montre les protéines reconnues par nos anticorps polyclonaux. La protéine de 38 kDa y figure bien sûr.

Finalement, le troisième puits "P" représente toutes les protéines qui ont été reconnues grâce à leur groupement "NH₂" terminal. En principe, cette trace devrait donc montrer absolument toutes les protéines présentes sur la membrane, les glycosylées et les non- glycosylées. D'ailleurs, comme on le voit dans la figure 12A, la trace "P" expose un nombre de protéines légèrement plus grand que dans la trace "MV". La raison pour cela est bien simple. Premièrement, nous avons généré nos anticorps seulement contre certaines de nos protéines. Deuxièmement, les anticorps que nous avons élevés n'ont pas nécessairement de la reconnaissance envers toutes les protéines. Certaines protéines, peut-être injectées en trop petites quantités, n'ont pas généré leur anticorps complémentaire en quantités suffisantes. Celui-ci a reconnu sa protéine complémentaire sur la membrane mais étant trop peu présent dès le départ, n'a pas été détecté par l'anticorps chèvre anti- lapin

Figure 11: A: Test de détection de la Rubisco. Présence de la grande sous-unité de la Rubisco à 48 kDa, dans notre matériel végétal, révélée par immunodétection après un transfert de type Western, sur membrane de nitrocellulose, des protéines des veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites au SB 1x. **B: Les protéines de l'exudat du phloème de *C. pepo*.** M: marqueur protéique, MV: protéines de 500 µl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, PP: protéines du phloème (PP1 et PP2), protéines de 50 µl de l'exudat de phloème tiré à la base du pétiole d'un cotylédon de *C. pepo*, Rubisco 1: petite sous- unité de la rubisco, Rubisco 2: grande sous- unité de la rubisco, GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.



conjugué à la phosphatase alcaline qui n'a pas, à son tour, été détectée par le substrat. Résultat: pas de précipité de couleur et pas de détection de la protéine en faible quantité. C'est pour cette raison que l'on observe plus de bandes dans la trace "P", où les protéines sont reconnues grâce à leur nature même que dans la trace "MV", où les protéines ne sont reconnues que si leur anticorps est présent. Bref, ce qui est important de noter est la présence de la protéine de 38 kDa dans les traces "MV" et "P" mais pas dans la trace "G".

La figure 12B représente les protéines reconnues par nos anticorps polyclonaux sur membrane de PVDF. Cette figure est présente en guise de comparaison avec les traces de la figure 12A. La trousse de Boehringer Mannheim prohibait l'utilisation de membranes de PVDF. Cependant, peut-être que sur une telle membrane nous aurions vu plus de bandes que sur une membrane de nitrocellulose. Reste que l'on est bel et bien informé à propos de la glycosylation de la protéine de 38 kDa.

Les jeunes cotylédons

Il nous fallait encore des résultats appuyant l'hypothèse de la protéine de 38 kDa comme protéine plasmodesmatale. Le fait de l'avoir choisie par défaut dans les expériences de séparation de phase et le fait qu'elle soit absente des parois cellulaires des protoplastes de *C. pepo* ne constituait pas une preuve complète à sa candidature. Nous avons alors pensé à la traquer dans les parois cellulaires des cellules des nervures mineures de *C. pepo*. Comme observé et étudié par Beebe et Russin (1999), les pd des cellules des nervures mineures de cotylédons âgés d'un jour sont très peu nombreux et sont de type primaire. Ce sont exactement ces pd que nous nous étions mis en tête d'isoler. En extrayant les protéines intégrales de pd de jeunes cotylédons, nous

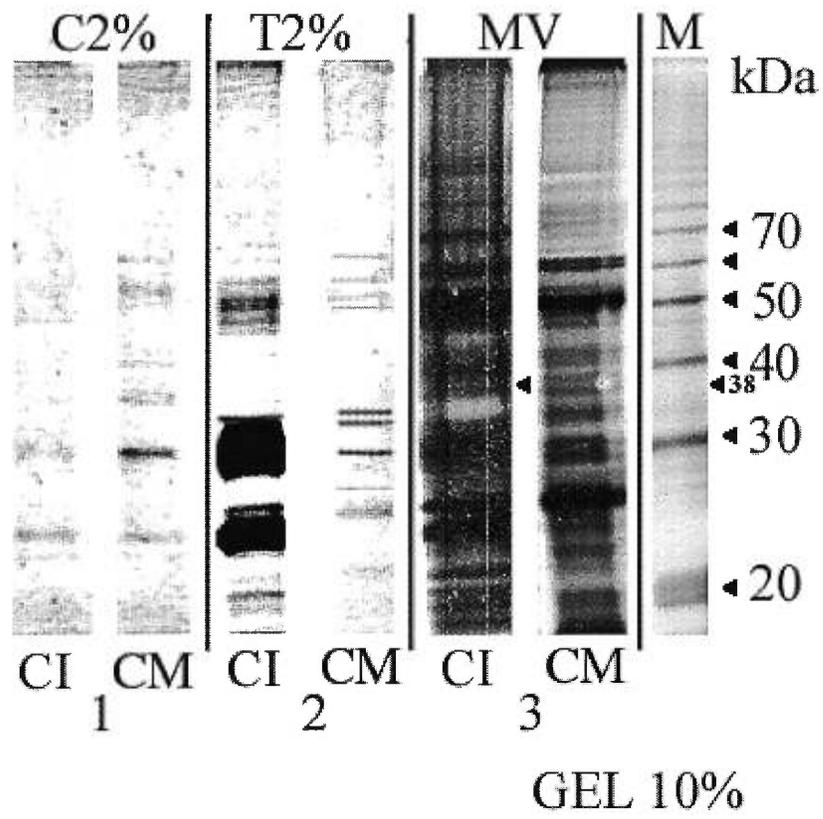
prévoyions une absence ou une légère diminution d'une ou de plusieurs protéines. De telles protéines seraient considérées comme protéines intégrales plasmodesmatales.

La figure 13 représente l'extraction des protéines des parois cellulaires des nervures mineures de cotylédons âgés d'un jour en comparaison avec les protéines de cotylédons âgés de sept à dix jours. Les protéines, pour plus de comparaison entre les différents extraits, ont été extraites avec le Triton X-100 2%, le CHAPS 2%, le CaCl_2 2% ainsi qu'avec le SB 1x. Ce qui était aussi intéressant d'observer dans une telle figure étaient les manifestations de notre candidate plasmodesmatale de 38 kDa.

Bien qu'il soit impossible d'observer beaucoup de détails sur le matériel de reproduction (fig. 13, p. 59), on peut suivre avec plus de précision certaines bandes peptidiques sur le matériel original. La bande de 38 kDa était absente chez les jeunes cotylédons, sauf dans l'extrait tiré à partir des jeunes cotylédons avec le SB 1x (trace "MV/CI", fig. 13, p. 59), où elle était très faiblement présente par rapport à l'extrait de protéines de cotylédons matures.

En général on peut dire qu'il a été difficile d'analyser la figure 13 puisqu'une protéine en particulier sortait bien avec le Triton par exemple, tandis qu'elle n'était pas extraite par le CHAPS et n'était que très faiblement tirée par le SB 1x. Nous ne savons pas ce qui cause un tel comportement. Il est évident qu'avec différents détergents nous extrayions différentes protéines. Cependant, il nous est impossible de prévoir avec quel détergent telle protéine serait extraite. Nous remarquons par contre que le SB 1x extrait toutes les protéines que les autres détergents ne semblent pas extraire. C'est souvent notre extracteur de référence. Alors que le SB extrait toutes les protéines, le CHAPS et le Triton X-100 semblent être plus sélectifs.

Figure 13: Extraction et migration sur gel polyacrylamide des protéines des veines mineures (7-10 jours) des cotylédons matures et immatures (1 jour) de *C. pepo*. M: marqueur protéique, MV: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, T 2%: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du Triton X-100 2%, C 2%: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du CHAPS 2%, CI: cotylédons immatures (1 jour), CM: cotylédons matures (7-10 jours), GEL 10%: gel de 10% polyacrylamide.



Le tableau III montre les protéines extraites par le CHAPS ou le Triton X-100 qui sont présentes dans les parois cellulaires de cotylédons matures, et absentes de celles de jeunes cotylédons. Il existe certaines protéines qui sont présentes en quantités immenses dans les jeunes cotylédons en comparaison à leur quantité dans les cotylédons matures. Les deux protéines les plus évidentes sont celles de 24 et de 31 kDa. La dernière est une protéine qui est extraite en quantités immenses dans les jeunes cotylédons alors qu'elle n'est qu'à peine détectable dans les cotylédons plus âgés. La protéine de 24 kDa est exclusive aux jeunes cotylédons. Les quantités qui marquent sa présence sont en effet surprenantes. Il ne faut pas oublier toutefois que quelle que soit la bande et son exclusivité, elle est toujours présente dans la fraction tirée au SB 1x, même en quantités infimes.

Pour en revenir à la bande de 38 kDa, on voit qu'elle est totalement absente des jeunes cotylédons alors qu'elle est présente dans les cotylédons matures. Par ailleurs elle est faiblement extraite par le SB 1x, même de l'extrait de protéines provenant de jeunes cotylédons. Qu'est ce que cela veut-il dire? Est-ce là une protéine plasmodesmatale? L'étape logique à suivre est l'isolement et le séquençage de cette protéine. Mais avant de passer à cette étape cruciale, voyons s'il y a encore des tests que nous pouvons mener.

L'extraction au CaCl₂

La protéine de 38 kDa n'est pas extraite par le CaCl₂ comme démontré par la figure 14 . Nous avons incubé notre matériel végétal dans du 50, du 100 et du 200 mM CaCl₂, pendant une heure à 4°C. Nous avons brassé le mélange pour permettre au sel d'accéder à tout le matériel végétal et nous avons extrait les protéines avec le CaCl₂. Le repliement des protéines globulaires et le

	Protéines extraites avec le CHAPS	Protéines extraites avec le Triton X-100
Protéines présentes seulement dans jeunes cotylédons	23 et ~ 52 kDa	Plusieurs bandes au- dessus de 50 kDa, 48, 41, 39, 31, 24, 23, 21 et 20 kDa
Protéines présentes seulement dans cotylédons matures	37, 38 et 41 kDa	34 et 38 kDa

Tableau III: Tableau des protéines extraites avec le CHAPS 2% ou le Triton X-100 2% qui sont présentes dans les jeunes cotylédons et absentes dans les cotylédons matures de *C. pepo*.

maintien de leur structure originelle relèvent de plusieurs types d'interactions. L'effet hydrophobe est l'inducteur principal du repliement d'une chaîne protéique (Horton 1994). Les chaînes non- polaires sont entraînées vers le cœur de la molécule et la plupart des chaînes polaires restent au contact de l'eau, à la surface de la molécule. Les liaisons hydrogène contribuent au repliement coopératif et assurent le maintien des conformations originelles des protéines globulaires. De plus, la stabilité de ces dernières est favorisée par un tassement atomique adéquat qui rend optimales les interactions de van der Waals entre résidus non- polaires. Finalement des ponts covalents, telles les liaisons disulfure, participent à la stabilisation de la conformation de certaines protéines globulaires. Par ailleurs, cette stabilité des protéines tire aussi bénéfice, à un moindre degré, d'interactions ioniques (repoussées à la surface) entre chaînes latérales de charges opposées.

Les protéines maintiennent leur structure et leur activité biologique à l'intérieur de certaines valeurs de pH, de température et de force ionique de la solution dans laquelle elles baignent (Seyhan et Ege 1994). Tout changement de pH et de température, ainsi que toutes additions de bases, d'acides, d'ions métalliques, d'urée et de sels à une solution protéique, peuvent dénaturer les protéines. La force ionique d'une solution dépend de la concentration et du nombre des charges électriques sur les cations et les anions du sel en solution. L'addition de sels comme le CaCl_2 en faibles concentrations, augmente la solubilité des protéines dans l'eau (Lehninger 1975). Ainsi, plus la concentration en sel est faible (jusqu'à un certain point) et plus la force ionique de la solution est faible. Finalement, plus une force ionique est faible et plus la solubilité de la protéine augmente grâce aux groupes R de la protéines qui s'ionisent de plus en plus. (White 1973) En effet, les ions du sel

Figure 14: Extraction des protéines des veines mineures de *C. pepo* au CaCl_2 . Extraction des protéines des veines mineures de *C. pepo* par incubation dans du 50, 100 et 200 mM CaCl_2 , pendant une heure à 4°C. Les flèches marquent la présence d'une bande à 38 kDa, si la protéine en question avait été présente. M: marqueur protéique, MV: protéines de 500 µl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.

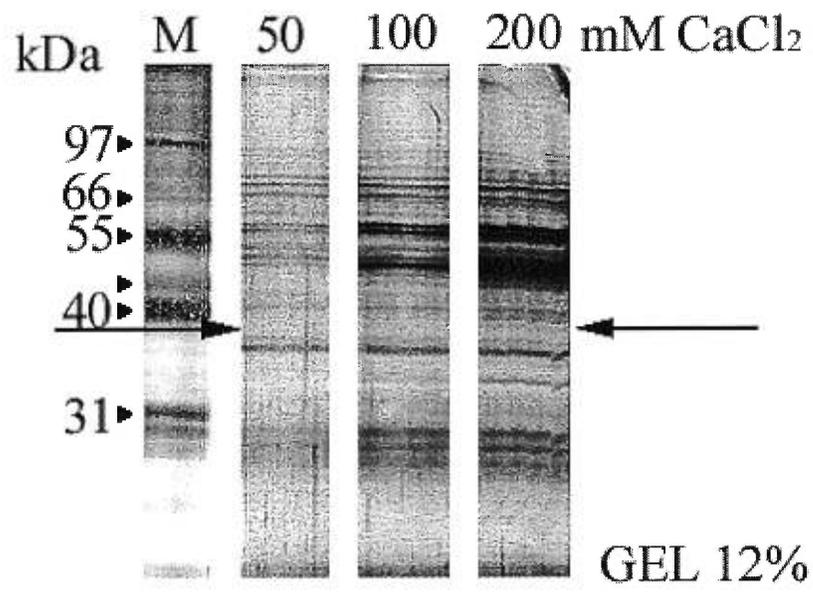
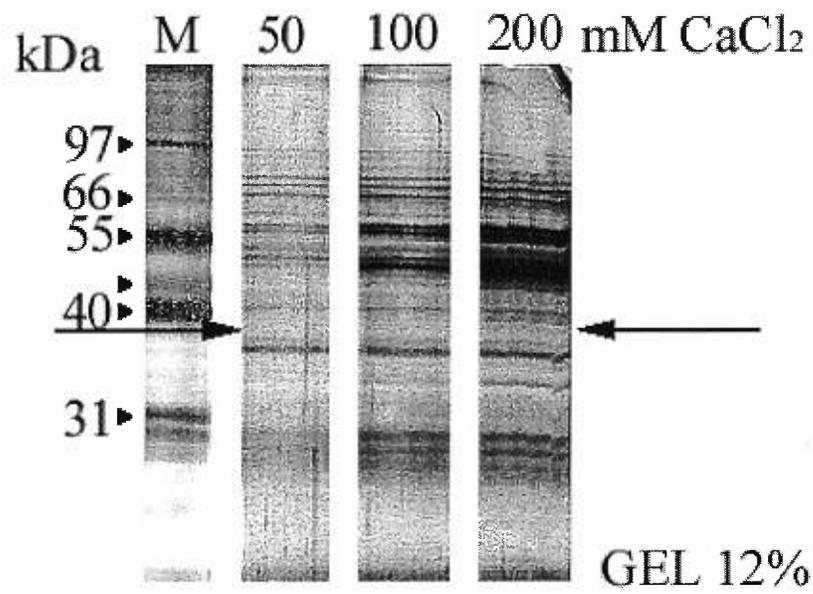


Figure 14: Extraction des protéines des veines mineures de *C. pepo* au CaCl_2 . Extraction des protéines des veines mineures de *C. pepo* par incubation dans du 50, 100 et 200 mM CaCl_2 , pendant une heure à 4°C. Les flèches marquent la présence d'une bande à 38 kDa, si la protéine en question avait été présente. M: marqueur protéique, MV: protéines de 500 μl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.



interagissent avec les groupes ioniques de la molécule, décroissant ainsi les interactions au sein de la protéine même, ce qui accroît sa solubilité.

La protéine de 38 kDa est absente des trois traces de la figure 14. Connaissant les liens moléculaires que le sel brise, peut-on dire que la protéine de 38 kDa est une protéine qui est fortement liée à la paroi cellulaire? Tout porte à croire que ce soit une protéine intégrale de la paroi cellulaire et non pas une protéine de surface. Elle n'est pas liée par des liens H ou des liaisons ioniques puisqu'elle n'est pas extraite par le sel. Elle semble être fortement attachée à la paroi.

Extractions en série

Pour le séquençage de la protéine de 38 kDa, il nous restait à trouver l'agent extracteur le plus puissant, à voire le détergent avec lequel la protéine de 38 kDa était le plus abondamment extraite. Nous avons alors mené des extractions en série avec ou sans division du culot. L'idée principale derrière nos extractions en série était de faire passer le même échantillon sous l'action de plusieurs détergents, l'un à la suite de l'autre et de voir qu'est- ce que chaque détergent extrait et/ou n'extrait pas. Il était ainsi possible de voir dans quel détergent une protéine en particulier sortirait le mieux.

Il est vrai qu'en faisant des extractions régulières, nous pouvions savoir avec quel détergent la protéine de 38 kDa était extraite. Nous l'avons d'ailleurs fait. Le problème avec les extractions régulières, comme les extractions au SB 1x, au Triton X-100 2% ou au CHAPS 2%, c'est qu'elles extraient toutes la protéine en question. Ce n'est d'ailleurs pas étonnant: l'agent extracteur étant assez concentré, mis en présence d'un matériel végétal riche, n'ayant pas

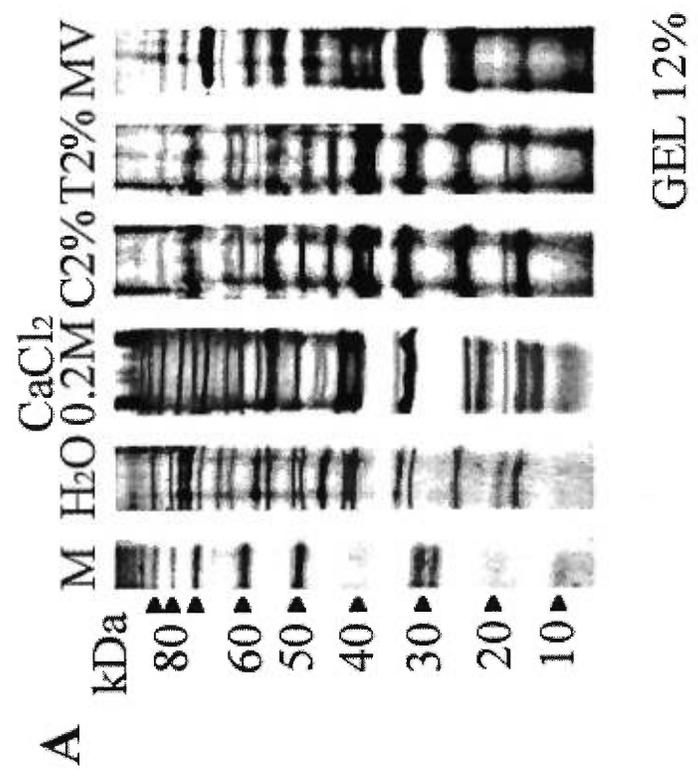
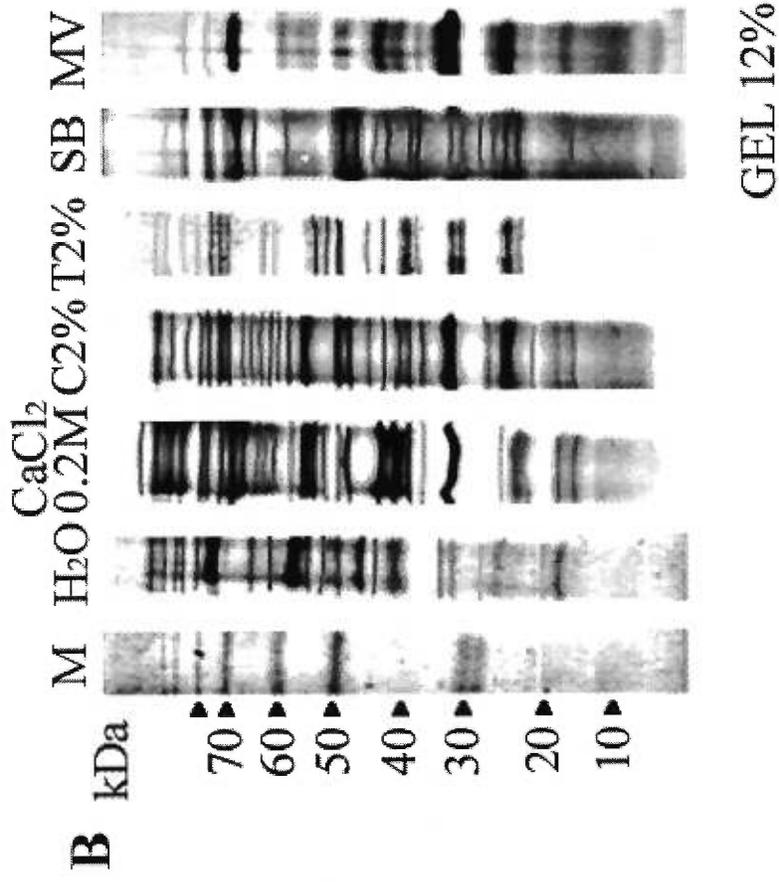
encore subi l'action d'aucun autre agent extracteur, extrait presque toutes les protéines, tant il y en a.

Pour débiter nous avons mené des extractions en série sans division du culot (fig. 15, p. 69). Nous commençons avec 250 à 500 μ l de matériel végétal et nous les incubons deux heures à 4°C avec de l'eau. Les deux heures passées, nous récoltions l'extrait et exposons le culot au prochain agent extracteur et ainsi de suite. Les deux derniers agents étaient toujours, et dans l'ordre respectif, le CHAPS 2% et le Triton X-100 2%. Cependant, en faisant des extractions régulières en parallèle avec les extractions en série, nous avons remarqué que le CHAPS et le Triton X-100 extraient plus ou moins les mêmes protéines.

Il n'y a qu'à observer le patron de protéines dans les traces "C 2%" et "T2%" de la figure 15A. De plus, dans les extractions en série sans division du culot, la protéine de 38 kDa est totalement absente de la trace "T2%". Elle est par contre entièrement présente dans la trace "C2%". Nous en avons par contre conclu que dans les extractions en série, en faisant passer le CHAPS avant le Triton X-100 le premier privait peut-être le dernier de quelques bandes qu'il aurait facilement extraites si justement il n'avait pas été passé en dernier. C'est pour cette raison que nous avons décidé de mener des extractions en série, mais avec division des culots juste avant de procéder aux extractions avec le Triton X-100 et le CHAPS. Nous divisons donc en deux le culot préalablement extrait avec l'eau et le sel et extrayons une moitié au Triton X-100 et une autre au CHAPS.

Le résultat de cette expérience est présenté à la figure 16, où les protéines ont été séparées sur un gel de 12x16 cm pour permettre une meilleure migration des protéines. Dans l'extraction en série avec division des

Figure 15: Patron sur gel de polyacrylamide d'une extraction en série comparée avec une extraction régulière. **A:** Extractions régulières des protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites avec du H₂O, du CaCl₂ 0.2 M, du CHAPS 2% ou du Triton X-100 2%. **B:** Extraction en série des protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites en série avec et dans l'ordre suivant: du H₂O, du CaCl₂ 0.2 M, du CHAPS 2% et du Triton X-100 2%. M: marqueur protéique, MV: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, T 2%: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du Triton X-100 2%, C 2%: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du CHAPS 2%, CaCl₂ 0.2 M: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du CaCl₂ 0.2 M, SB: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du SB, H₂O: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du H₂O, GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.



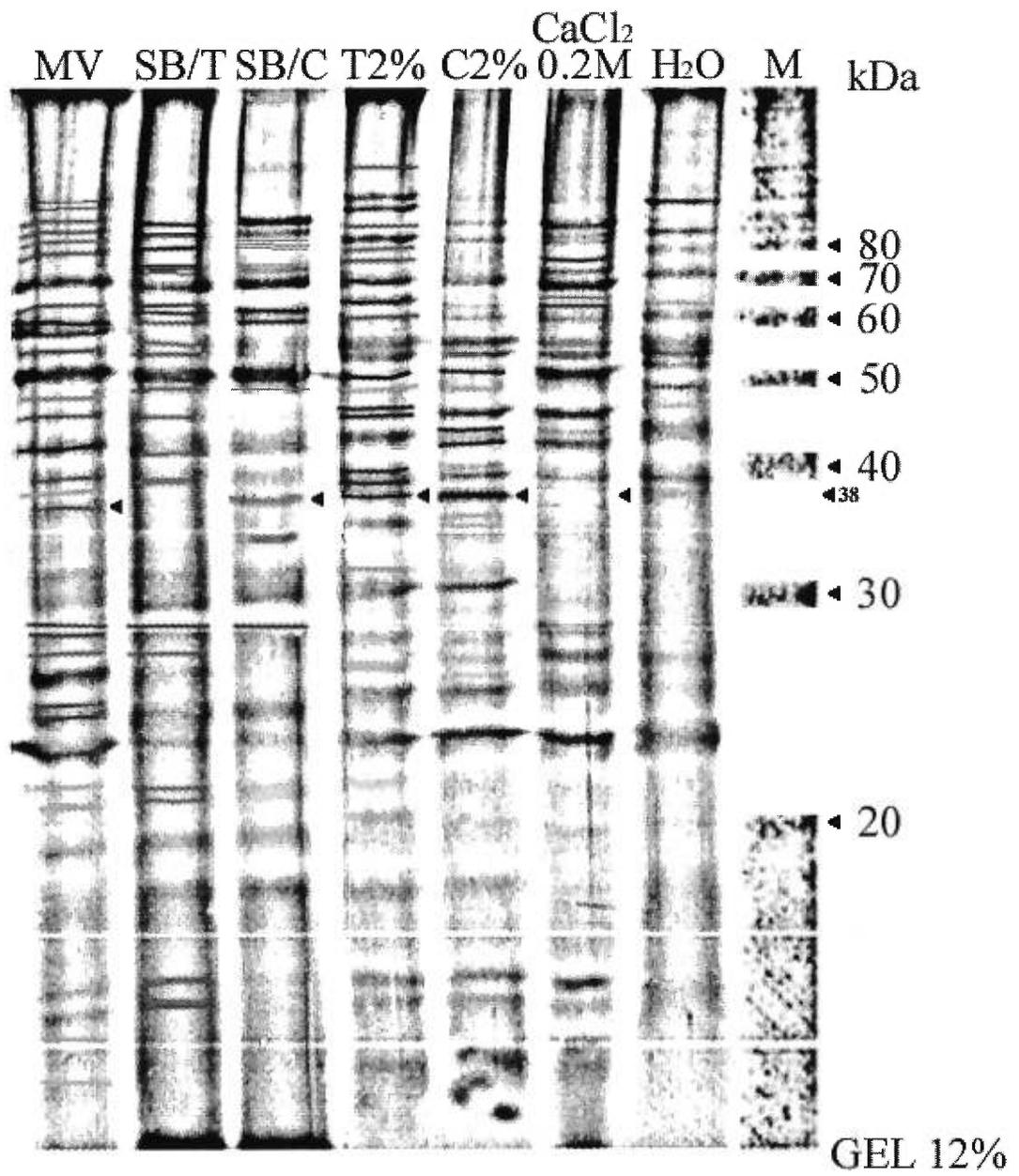
culots (fig. 16, p. 71), la protéine de 38 kDa est aussi absente des extraits tirés à l'eau et au CaCl_2 . Ce qui est remarquable toutefois c'est qu'avec la division des culots elle soit devenue présente dans l'extrait au Triton X-100 et dans celui au CHAPS. Cependant, elle est mieux sortie avec le CHAPS bien qu'elle ait été présente dans les deux culots en quantités égales. Il n'y qu'à voir l'épaisseur de la bande à 38 kDa dans la trace "C2%" de la figure 16. Elle est bien plus considérable que celle de la trace "T2%".

De plus, lorsqu'on a extrait au SB 1x les culots laissées par le CHAPS et le Triton X-100 pour voir ce qui a été extrait et ce qui est resté, nous avons remarqué que le Triton X-100 avait extrait la protéine de 38 kDa au complet contrairement au CHAPS. En effet, dans la trace "SB/T" de la figure 16, nous remarquons une absence totale de la protéine de 38 kDa. Dans la trace "SB/C" par contre, la protéine y est très faiblement présente. Il est donc certain qu'avec un volume de CHAPS un peu plus grand, nous aurions extrait la protéine au complet et en quantités bien suffisantes pour la faire séquencer.

Séquençage de la protéine de 38 kDa

Après avoir tant ciblé cette protéine et après avoir observé son comportement le long de toutes nos expériences, nous devions finalement la séquencer. Nous l'avons fait au laboratoire de microchimie de Harvard. Afin de leur faire parvenir notre protéine, nous devions la faire migrer sur un gel de polyacrylamide que nous devions colorer au Bleu de Coomassie par la suite, et non pas au nitrate d'argent. Une fois la protéine repérée sur le gel, nous n'avions plus qu'à la découper, la poser délicatement au fond d'un eppendorf, et l'envoyer à Harvard. En faisant migrer quelques échantillons d'ovalbumine à des concentrations connues, nous avons grossièrement estimé la

Figure 16: Patron protéique des extractions en série des protéines des veines mineures de *C. pepo*, migrées sur gel de polyacrylamide de 12x16 cm. L'extraction en série s'est faite dans l'ordre suivant: H₂O, CaCl₂ 0.2 M, division des culots en deux, CHAPS 2%, Triton X-100 2% et extraction finale des culots des deux moitiés au SB 1x (SB/T et/ou SB/C). M: marqueur protéique, MV: protéines de 250 µl de veines mineures de *C. pepo*, bouillies et extraites avec du SB 1x, T 2%: protéines de 3 ml de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du Triton X-100 2%, C 2%: protéines de 3 ml de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du CHAPS 2%, CaCl₂ 0.2 M: protéines de 3 ml de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du CaCl₂ 0.2 M, H₂O: protéines de 3 ml de veines mineures de *C. pepo*, extraites pendant deux heures à 4°C, avec du H₂O, GEL 12%: gel de 12% polyacrylamide.



concentration de notre protéine d'intérêt. Ainsi donc nous avons envoyé près de 300 pmol de la protéine de 38 kDa pour la faire séquencer.

À l'arrivée de notre protéine au laboratoire de biochimie de Harvard, celle-ci a premièrement été digérée par digestion tryptique. Les peptides ont ensuite été séparés par chromatographie liquide microcapillaire de haute performance (microcapillary HPLC). Les peptides séparés se faisaient traiter sur le champ par un spectromètre de masse. Les spectres obtenus pour chaque peptide étaient comparés aux spectres anticipés pour des séquences de protéines connues dans les banques de données. Ainsi alors, nous avons obtenu les séquences peptidiques de notre protéine grâce à de l'analyse de corrélation et ce, à partir des résultats d'une digestion suivie d'une séparation chromatographique des peptides.

Nous avons donc appris que la protéine de 38 kDa était inconnue. Cela veut dire que personne n'a jamais tenté de séquencer une telle protéine. Ce qui nous le fait dire est le fait que les peptides ne se sont comparées à aucune protéine en particulier dans la banque de données. Au contraire, nos peptides ont trouvé leurs homologues de séquences chez 16 protéines différentes, dont six déshydrogénases. Le tableau IV présente les protéines avec lesquelles les séquences peptidiques partagent une certaine similarité. Si notre peptide possède dix acides aminés et que la protéine chez laquelle il a trouvé de la similarité en possède 300, le pourcentage de similarité est alors de 3%. Cette similarité de séquence est mesurée en pourcentage de similarité. Ce nombre n'a pas pu être calculé lorsque la séquence d'une certaine protéine était non disponible dans la banque de données. C'est le cas pour la déshydrogénase #11.

Tableau IV: Liste des protéines partageant une similarité de séquence avec la protéine de 38 kDa. Ds: dans, -: information non- disponible.

	Type de la protéine cible	# d'acides aminés identiques/# total d'acides aminés de la protéine cible	% de similarité	Particularités de la protéine cible
1	Déshydrogénase	56/348	16	chez Cucurbitacées, ds matrice mitochondriale, ds tissu cotylédonaire
2	Déshydrogénase	63/333	19	ds cytosol, ds tissu foliaire
3	Déshydrogénase	13/333	4	ds cytosol
4	Déshydrogénase	37/338	11	ds cytosol
5	Synthase (ATP)	34/378	9	ds membrane thylakoïde, ds tissu foliaire
6	Carboxylase/ Oxygénase	34/338	10	ds stroma chloroplastique
7	Synthase (ATP)	7/374	2	ds membrane thylakoïde
8	Précurseur de l'apocytochrome F	26/321	8	ds membrane thylakoïde, ds tissu caulinaire
9	Pectinase	29/363	8	ds paroi cellulaire
10	Déshydrogénase	20/333	6	ds cytoplasme
11	Déshydrogénase	-	-	-
12	Putative	16/396	4	-
13	Photosystème II	24/348	7	ds membrane thylakoïde
14	Aldolase	27/379	7	ds cytoplasme, ds stroma chloroplastique
15	Canal membranaire	15/377	4	ds membrane mitochondriale, taille de 36 kDa, conformation active
16	Peroxydase	10/332	3	ds tous tissus

La 3^{ème} colonne du tableau représente les particularités qui ont attiré notre attention chez ces protéines. C'est là-dessus que notre regard s'est posé lorsque nous avons vu des similarités entre ces protéines et notre protéine de 38 kDa. Sur ce, il est donc important de noter ce qui a été souligné dans le tableau IV: premièrement, six des 16 protéines qui partagent de la similarité de séquence avec nos peptides sont des déshydrogénases. De plus, le pourcentage de similarité le plus fort existe avec trois de ces déshydrogénases. Il est de 19, 16 et 11% comparé au faible pourcentage de 2, 4 ou 6% avec d'autres protéines. Finalement, une de ces déshydrogénases se retrouve chez les Cucurbitacées et dans le tissu cotylédonaire!

Un petit 8% de similarité est partagé avec une pectinase qui se retrouve dans la paroi cellulaire, pareillement à notre protéine de 38 kDa. La dernière protéine que nous avons jugée digne de mention est la quinzième dans le tableau IV. Il est encourageant de constater que cette protéine forme un canal membranaire à travers la membrane mitochondriale de *Solanum tuberosum*, qui permet la diffusion de petites molécules hydrophiles (Ehlers *et al.* 1996). Que de termes qui semblent familiers! Non seulement cette protéine a une taille de 36 kDa, mais elle contrôle activement le passage à travers la membrane de la mitochondrie en adoptant des conformations ouvertes et fermées selon le voltage membranaire.

Nous possédons donc maintenant la séquence de notre protéine mais sous forme de petits peptides. Nous avons pu la comparer à plusieurs protéines qui non seulement semblent posséder des séquences en commun avec la protéine de 38 kDa, mais qui se caractérisent aussi par certains traits qui ressemblent intimement à certains chez notre protéine, ou du moins à certains traits que l'on s'attendrait à trouver chez notre protéine. Ce que nous ignorons encore c'est la disposition de ces séquences peptidiques à l'intérieur

de la protéine ainsi que les résultats d'expériences d'immunolocalisation pour confirmer la réaction de notre protéine avec les pd sur des coupes de nervures mineures de cotylédons de *C. pepo*.

CONCLUSION

Le but de ce projet de maîtrise était d'isoler, de caractériser et de séquencer une protéine plasmodesmatale, présente dans les cellules des nervures mineures des cotylédons de *C. pepo*. Menés par nos tests et expériences, nous avons isolé une protéine de 38 kDa. Cette protéine s'est manifestée comme candidate plasmodesmatale dans nos travaux. Ce fût la seule et unique protéine qui sortait constamment comme protéine plasmodesmatale du début jusqu'à la fin de nos expériences.

Effectivement, lorsque nous nous attendions à ce que la composante plasmodesmatale soit hydrophile à cause de son exposition constante au passage cytoplasmique, la protéine de 38 kDa s'est manifestée comme protéine hydrophile.

D'autre part, lorsque nous avons extrait la composante des parois cellulaires des protoplastes dépourvus de pd de *C. pepo*, nous avons trouvé que la protéine de 38 kDa manquait à l'appel. En d'autres termes, la protéine de 38 kDa était absente d'un extrait protéique de parois cellulaires démunies de pd.

D'un autre côté, lorsque nous avons fait l'inventaire des protéines des parois cellulaires des nervures mineures de jeunes cotylédons, chez qui il n'y a que des pd de type primaire pour assurer la communication entre les cellules, nous n'y avons pas déniché la protéine de 38 kDa. Ceci signifie que cette dernière est absente d'un matériel manquant de pd secondaires. Cette protéine donc doit être une composante de pd secondaires.

De plus, notre protéine n'a pu être extraite que par des détergents comme le CHAPS, le Triton X-100 et le SDS. L'eau et le sel, des agents qui ne s'attaquent pas à la paroi cellulaire, n'ont pas pu extraire la protéine. Les détergents par contre, aidés par leur nature même, ont facilement solubilisé la membrane pour se lier à ses composantes protéiques. Ceci prouve donc que la protéine de 38 kDa est une protéine intégrale de la paroi cellulaire.

Finalement, lorsque nous avons séquencé la protéine de 38 kDa, les séquences nous ont confirmé que nous avions là une protéine qui n'avait jamais été séquencée de *C. pepo*, chez qui, de toute façon, aucune composante plasmodesmatale n'a encore été identifiée ou même isolée. Par ailleurs, près de la majorité des peptides analysés formant notre protéine partagent une similarité de séquence avec des protéines membranaires, dont la plupart sont des déshydrogénases. Le fait que ces protéines soient majoritairement des protéines membranaires nous rapproche plus de notre objectif qui vise à identifier des protéines de la paroi cellulaire.

Cet objectif aurait été parfaitement atteint si nous avions tenté de détecter notre protéine sur de fines coupes de cellules de nervures mineures par immunolocalisation, grâce à des anticorps monoclonaux. Mon projet de maîtrise s'achève donc sur une note incroyablement intrigante. Tout porte à croire que la protéine de 38 kDa soit une composante plasmodesmatale, cependant, ceci restera une histoire à suivre.

RÉFÉRENCES

Anderson J.M., Palukaitis P., Zaitlin M. 1992 *A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants.* Proc. Natl. Sci. USA 89: 8759- 8763.

Baron- Eppel O., Hernandes D., Jiang L.W., Meiners S., Schindler M. 1988 *Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells.* J. Cell Biol. 106: 715- 721.

Beebe D.U., Evert R.F. 1992 *Photoassimilate pathway(s) and phloem loading in the leaf of Moricandia arvensis (L.) DC. (Brassicaceae).* Int. J. Plant Sci. 153: 61- 77.

Beebe D.U., Russin W.A. 1999 *Plasmodesmata in the phloem- loading pathways*. Dans: **van Bel A.J.E., van Kesteren W.J.P.**, (eds) *Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 261- 293.

Biserka J., Sibila J. 1991 *plant development in long- term embryogenic callus lines of Cucurbita pepo*. Plant Cell Reports 9: 623- 626.

Blackman L.M., Overall R.L. 1998 *Immunolocalisation of the cytoskeleton to plasmodesmata of Chara corallina*. Plant J. 14: 733- 741.

Bordier C. 1981 *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution*. J. Biol. Chem. 256 (4): 1604- 1607.

Botha C.E.J., Hartley B.J., Goss R.H.M. 1993 *The ultrastructure and computer- enhanced digital image analysis of plasmodesmata at the Kranz mesophyll- bundle sheath interface of Themeda triandra var. imberbis (Retz) A. Camus in conventionally- fixed leaf blades*. Ann. Bot. 72: 255- 261.

Clark A.M., Jacobsen K.R., Bostwick D.E., Dannenhoffer J.M., Skaggs M.I., Thompson G.A. 1997 *Molecular characterization of a phloem- specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from Cucurbita maxima*. Plant J. 12: 49- 61.

Citovsky V., Wong M.L., Shaw A.L., Venkataram Prasad B.V., Zambryski P. 1992 *Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single- stranded nucleic acids*. Plant Cell 4: 397- 411.

Collins M.L., Salton M. 1979 *Solubility characteristics of Micrococcus Lysodeikticus membrane components in detergents and chaotropic salts analysed by immunoelectrophoresis.* Biochimica et Biophysica Acta 553: 40-53.

Cook M.E., Graham L.E., Botha C.E.J., Lavin C.A. 1997 *Comparative ultrastructure of plasmodesmata of Chara and selected bryophytes: toward an elucidation of the evolutionary origin of plant plasmodesmata.* Am. J. Bot. 84: 1169- 1178.

Cronin S., Verchot J., Haldeman- Cahill R., Schaad M.C., Carrington J.C. 1995 *Long- distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase.* Plant Cell 7: 549- 559.

Dannenhoffer J.M., Evert R.F. 1994 *Development of the vascular system in the leaf of barley (Hordeum vulgare L.).* Int. J. Plant Sci. 155: 143- 157.

Deutscher M.P. 1990 *Methods in enzymology: Guide to protein purification.* 182: 239- 282.

Ding B. 1998 *Intercellular protein trafficking through plasmodesmata.* Plant Mol. Biol. 38: 279- 310.

Ding B., Haudenschild J.S., Hull R.J., Wolf S., Beachy R.N., Lucas W.J. 1992 *Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants.* Plant Cell 4: 915- 928.

Ehlers K., Kollmann R. 1996 *Formation of branched plasmodesmata in regenerating Solanum nigrum- protoplasts.* Planta 199: 126- 138.

Ehlers K., Schulz M., Kollmann R. 1996 *Subcellular localization of ubiquitin in plant protoplasts and the function of ubiquitin in selective degradation of outer- wall plasmodesmata in regenerating protoplasts.* Planta 199: 139- 151

Erwee M.G., Goodwin P.B. 1984 *Characterization of the Egeria densa leaf symplast response to plasmolysis, deplasmolysis and to aromatic amino acids.* Protoplasma 122: 162- 168.

Fisher D.G. 1991 *Plasmodesmatal frequency and other structural aspects of assimilate collection and phloem loading in leaves of Sonchus oleraceus (Asteraceae), a species with minor vein transfer cells.* Amer. J. Botany 78: 1549- 1559.

Gamalei Y.V., van Bel A.J.E., Pakhonova M.V., SjutkinaA. 1994 *Effects of temperature on the conformation of the endoplasmic reticulum and on starch accumulation in leaves with the symplasmic minor- vein configuration.* Planta 194: 443- 453.

Gagnon M.J., Beebe D.U. 1996 *Minor vein differentiation and the development of specialized plasmodesmata between companion cells and contiguous cells in expanding leaves of Moricanda arvensis (L.) DC. (Brassicaceae).* Int. J. Plant Sci. 157: 685- 697.

Ghoshroy S., Lartley R., Shang J., Citovsky V. 1997 *Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 27- 50.

Gonsalves C., Xue B., Gonsalves D. 1995 *Somatic embryogenesis and regeneration from cotyledon explants of six squash cultivars. HortScience* 30: 1295- 1297.

Hake S., Char B.R. 1997 *Cell-to-cell interactions during plant development. Genes Devel.* 11: 1087- 1097.

Horton R. H., Moran A. L., Ochs S.R., Rawn D. J., Scrimgeour G. K. 1994 *Principes de Biochimie.* De Boeck, Bruxelles.

Itaya A., Hickman H., Bao Y., Nelson R., Ding B. 1997 *Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein: green fluorescent protein fusion produced by biolistic bombardment in tobacco. Plant J.* 12: 1223- 1230.

Jacinto T, McGurl B., Franceschi V., Delano- Freir J., Ryan C.A. 1997 *Tomato prosystemin promoter confers wound- inducible, vascular bundle- specific expression of the β - glucuronidase gene in transgenic tomato plants. Planta* 203: 406- 412.

Jones M.G.K. 1976 *The origin and development of plasmodesmata.* Dans: **Gunning B.E.S., Robards A.W.,** (eds) *Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata.* Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 81- 105.

Kasteel D.T.J., Wellink J., Goldbach R.W., van Lent J.W.M. 1997 *Isolation and characterization of tubular structures of cowpea mosaic virus*. J. Gen. Virol. 78: 3167- 3170.

Kempers R., van Bel A.J.E. 1997 *Symplasmic connections between sieve elements and companion cells in the stem phloem of Vicia faba L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa*. Planta 201: 195- 201.

Knoblauch M., van Bel A.J.E. 1998 *Sieve tubes in action*. Plant Cell 10: 35- 50.

Kollmann R., Glockmann C. 1991 *Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface*. Protoplasma 165: 71- 85.

Lehninger A. L. 1975 *Biochemistry 2nd edition*. Worth Publishers, New York.

Lucas W.J., Bouche- Pillon S., Jackson D.P., Nguyen L., Baker L., Ding B., Hake S. 1995 *Selective trafficking of KNOTTED 1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata*. Science 270: 1980- 1983.

Lucas W.J., Ding B., van der Schoot C. 1993 *Plasmodesmata and the supracellular nature of plants*. New Phytol. 125: 435- 476.

Lucas W.J., Gilbertson R.L. 1994 *Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues*. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 387- 411.

McLean B.G., Hempel F.D., Zambryski P.C. 1997 *Plant intercellular communication via plasmodesmata*. Plant Cell 9: 1043- 1064.

Mehlin H., Daneholt B., Skoglund U. 1992 *Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography*. Cell 69: 605- 613.

Mezzit L.A., Lucas W.J. 1996 *Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids*. Plant Mol. Biol. 32: 251- 273.

Monzer J. 1990 *Secondary formation of plasmodesmata in culture cells- structural and functional aspects*. Dans: **Robards A.W., Jonsma H., Lucas W.J., Pitts J., Sprad D.** (eds) *Parallels in cell to cell junctions in plants and animals*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp. 185- 195.

Monzer J. 1991 *Ultrastructure of secondary plasmodesmata formation in regenerating Solanum nigrum- protoplasts cultures*. Protoplasma 165: 86- 95.

Moreno V., Zubeldia L., Roig L.A. 1984 *A method for obtaining callus cultures from mesophyll protoplasts of melon (Cucumis melo L.)*. Plant Science Letters 34: 195- 201.

Morozov S.Y., Fedorkin O.N., Juttner G., Schiemann J., Baulcombe D.C., Atabekov J.G. 1997 *Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes*. J. Gen. Virol. 78: 2077- 2083.

Overall R.L. 1999 *Substructure of plasmodesmata*. Dans: **van Bel A.J.E., van Kesteren W.J.P.**, (eds) *Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication*. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 261- 293.

Perbal M.C., Haughn G., Saedler H., Schwarz- Sommer Z. 1996 *Non-autonomous function of the Antirrhinum floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking*. Development 122: 3433- 3441.

Perbal M.C., Thomas C.L., Maule A.J. 1993 *Cauliflower mosaic virus gene I product (PI) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts*. Virology 195: 281- 285.

Peters J.M., Frank W.W., Kleinschmidt J.A. 1994 *Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm*. J. Biol. Chem. 269: 7709- 7718.

Polenko D.R., Maclachlan G.A. 1984 *Plasma- membrane sheets from pea protoplasts*. J. Exp. Bot. 35: 00- 08.

Radford J.E., Vesik M., Overall R.L. 1998 *Callose deposition at plasmodesmata*. Protoplasma 201: 30- 37.

Renjing L., Yongru S., Liming Z., Xianghui L. 1990 *Plant regeneration from cotyledon protoplasts of Xinjiang muskmelon*. Plant Cell Reports 9: 199- 203.

Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Stussi- Garaud C., Pinck L. 1995 *Grapevine fanleaf nepovirus p38 putative movement protein is located on tubules in vivo*. Mol. Plant- Microbe Interact 8: 379- 387.

Robards A.W., Lucas W.J. 1990 *Plasmodesmata*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 369- 419.

Robinson- Beers K., Evert R.F. 1991 *Fine structure of plasmodesmata in mature leaves of sugarcane*. Planta 184: 307- 318.

Robinson- Beers K., Evert R.F. 1991 *Ultrastructure of and plasmodesmatal frequency in mature leaves of sugarcane*. Planta 184: 291- 306.

Roig L.A., Roche M.V., Orts M.C., Zubeldia L., Moreno V. 1986 *Isolation and culture of protoplasts from Cucumis metuliferus and Cucurbita martinezii and a method for their fusion with Cucumis melo protoplasts*. Cucurbit Genetics Cooperative Annual Reports 9: 70- 73.

Rojas M.R., Zerbini F.M., Allison R.F., Gilbertson R.L., Lucas W.J. 1997 *Capsid protein and helper component- proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins*. Virology 237: 283- 295.

Russin W.A., Evert R.F. 1985 *Studies on the leaf of Populus deltoides (Salicaceae): Ultrastructure, plasmodesmatal frequency, and solute concentrations*. Amer. J. Bot. 72: 1232- 1247.

Russin W.A., Evert R.F., Vanderveer P.J., Sharkey T.D., Briggs S.P. 1996 *Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose ability in the sucrose export defective1 maize mutant*. Plant Cell 8: 645- 658.

Schulz A. 1995 *Plasmodesmal widening accompanies the short- term increase in symplasmic phloem unloading in pea root tips under osmotic stress.* Protoplasma 188: 22-37.

Seyhan N. E. 1994 *Organic Chemistry 3rd edition.* D.C. Heath and Company, Massachusetts.

Sussex I.M. 1989 *Developmental programming of the shoot meristem.* Cell 56: 225- 229.

Tucker E.B. 1988 *Inositol biphosphate et inositol triphosphate inhibit cell to cell passage of carboxylfluorescein in staminal hairs of Setcreasea purpurea.* Planta: 174: 358- 363.

Turgeon R. 1989 *The sink- source transition in leaves.* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 119- 138.

Turgeon R., Beebe D.U. 1991 *The evidence for symplastic phloem loading.* Plant Physiology 96: 349- 354.

Turgeon R., Webb J.A. 1976 *Leaf development and phloem transport in Cucurbita pepo: Maturation of the minor veins.* Planta 129: 265- 269.

Turner A., Well B., Roberts K. 1994 *Plasmodesmata of maize root tips: structure and composition.* J. Cell Sci 107: 3351- 3361.

van den Berg C., Willemsen V., Hage W., Weisbeek P., Scheres B. 1995 *Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signaling.* Nature: 62- 65.

Waigmann E., Turner A., Peart J., Roberts K., Zambryski P. 1997 *Ultrastructural analysis of leaf trichome plasmodesmata reveals major differences from mesophyll plasmodesmata.* Planta 203: 75- 84.

Wang M.B., Boulter D., Gatehouse J.A. 1994 *Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of Cucurbita pepo.* Plant Molecular Biology 24: 159- 170.

White A., Handler P., Smith E.L. 1973 *Principles of Biochemistry 5th edition.* McGraw- Hill, New York.

Wolf S., Deom C.M., Beachy R.N., Lucas W.J. 1989 *Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit.* Science 246: 377- 379.

Wray W., Boulikas T., Wray V.P., Hancock R. 1981 *Silver staining of proteins in polyacrylamid gels.* Analytical Biochemistry 118(1): 197- 203.

Zapata F.J., Evans P.K., Power J.B., Cocking E.C. 1977 *The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of Lycopersicon esculentum and Lycopersicon peruvianum.* Plant Science Letters 8: 119- 124.