



HAL
open science

REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU PROMOTEUR HMWG-DX5 DE BLE DANS L'ALBUMEN DE MAÏS ET CREATION DE PROMOTEURS CHIMERIQUES.

Frédéric Norre

► **To cite this version:**

Frédéric Norre. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU PROMOTEUR HMWG-DX5 DE BLE DANS L'ALBUMEN DE MAÏS ET CREATION DE PROMOTEURS CHIMERIQUES.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2002. Français. NNT: . tel-00371477

HAL Id: tel-00371477

<https://theses.hal.science/tel-00371477>

Submitted on 27 Mar 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

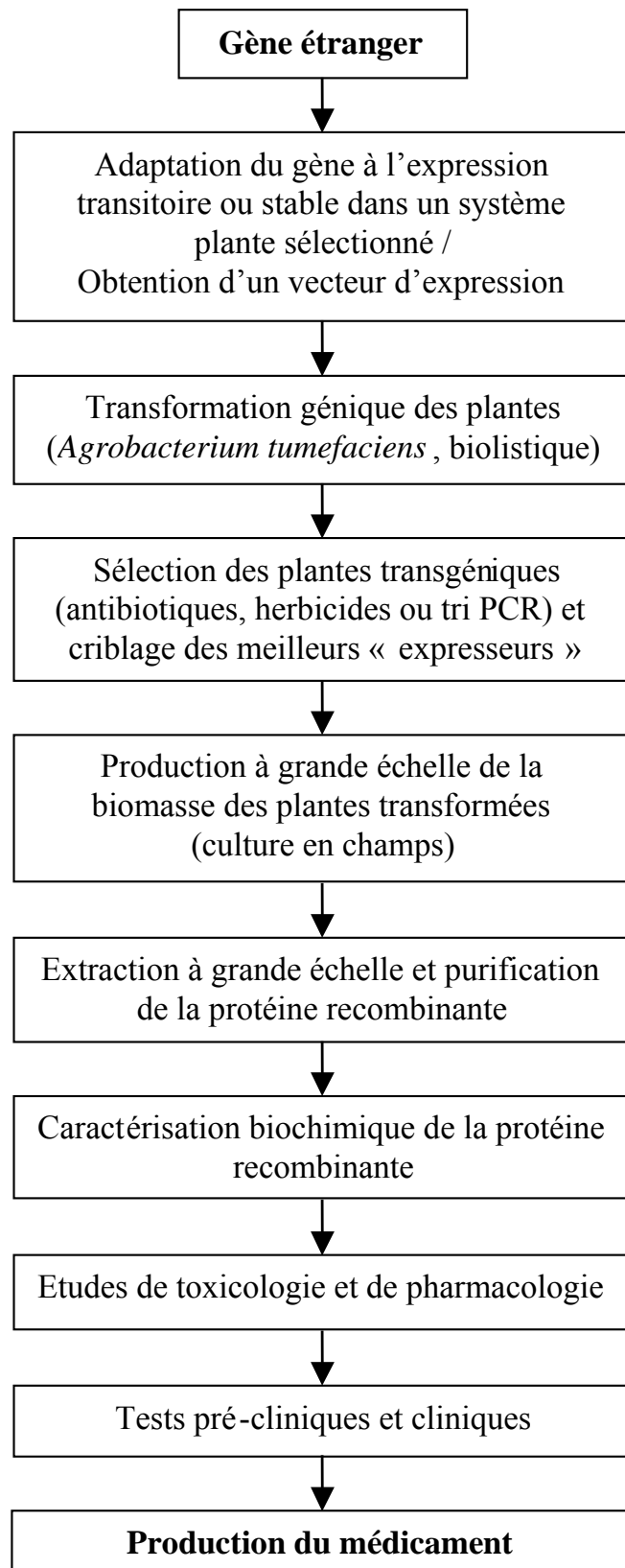


Figure 1 : Désignation des principales étapes qui conduisent à la production d'une protéine recombinante à intérêt thérapeutique dans les plantes (Gruber et Theisen, 2000)

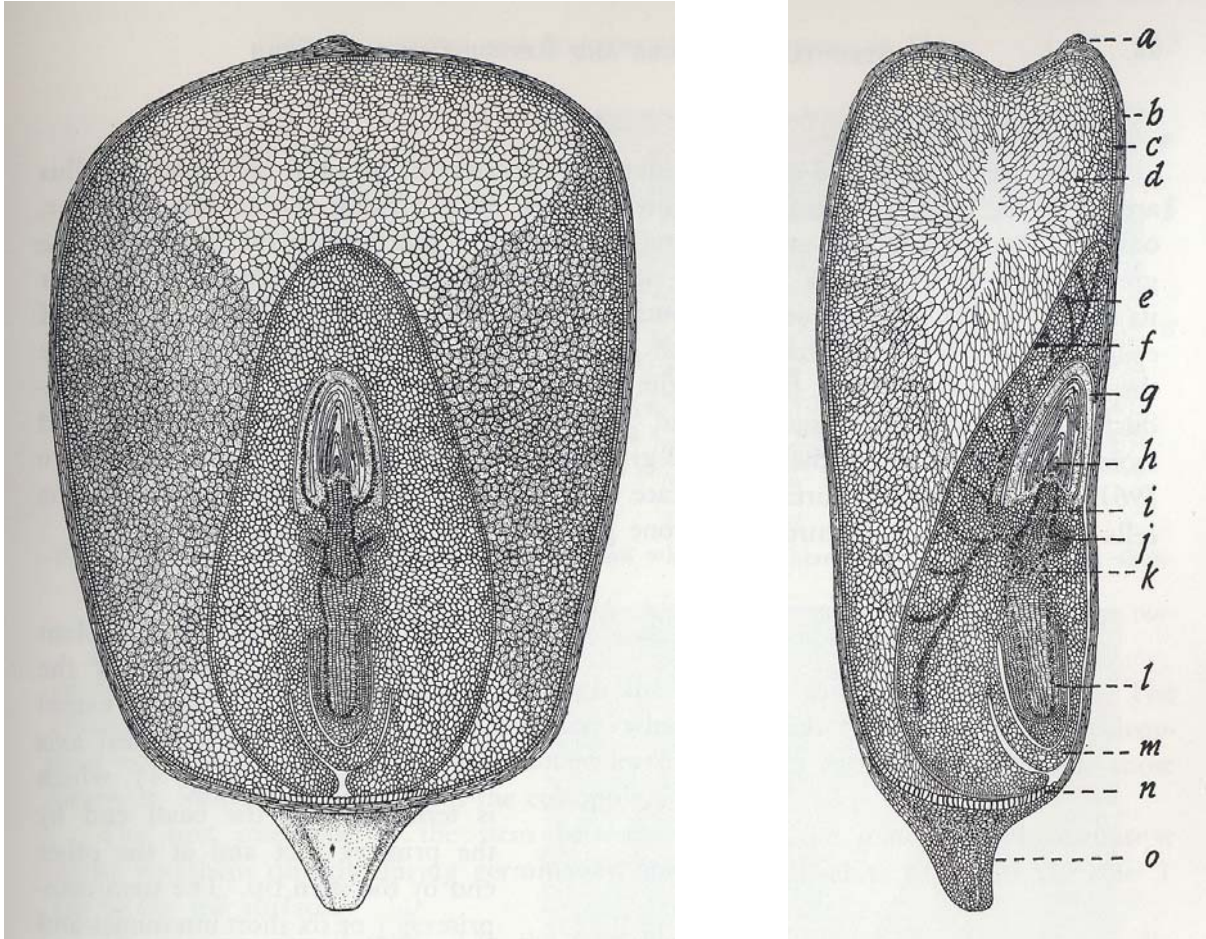


Figure 2 : Structure du grain de maïs. Sections verticales dans deux plans distincts d'un grain de maïs mature, montrant l'arrangement des organes et des tissus. **a**, cicatrice d'attachement de la soie ; **b**, péricarpe ; **c** aleurone ; **d**, albumen ; **e**, scutellum ; **f**, couche glandulaire du scutellum ; **g**, coléoptile ; **h**, plumule avec tige et feuilles ; **i**, premier internœud ; **j**, racine séminale latérale ; **k**, nœud scutellaire ; **l**, racine principale ; **m**, coléorhize ; **n**, cellules conductrices basales de l'albumen ; **o**, pédicelle. X 7. (Kiesselbach, 1999).

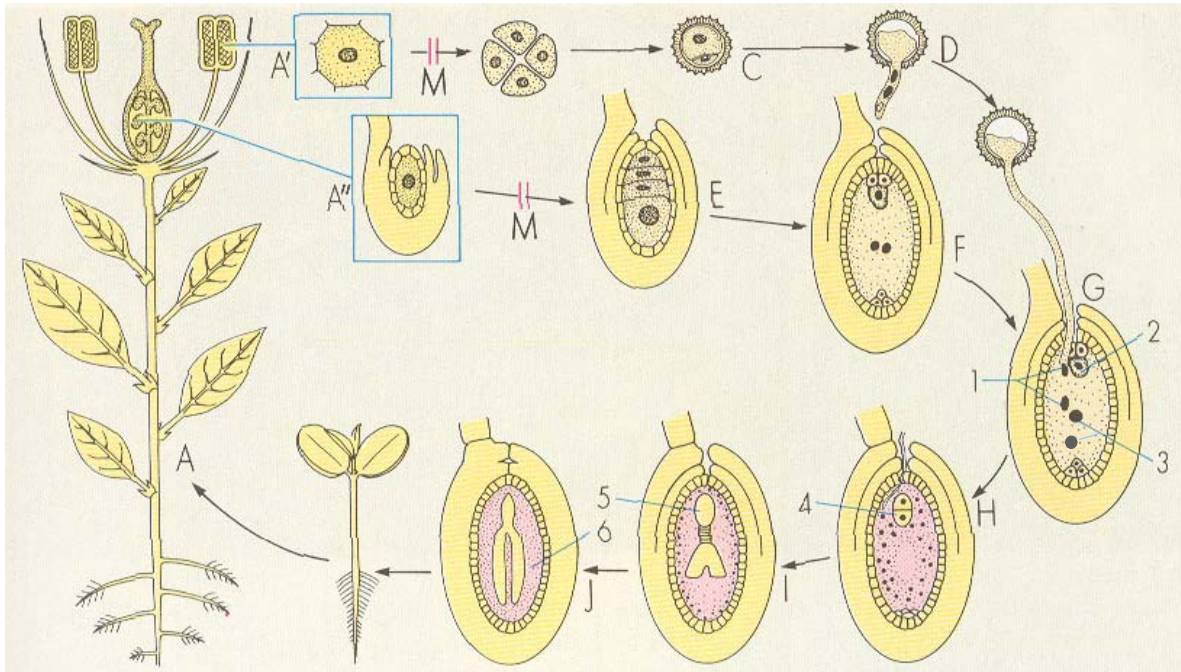


Figure 3 : Processus de double fécondation dans le cycle de vie des angiospermes. (A) Plante avec une fleur hermaphrodite et détail d'une cellule mère du pollen localisée à l'intérieur de l'étamine (A') et d'une cellule mère du sac embryonnaire (A''), (M) Division méiotique, (C) Grain de pollen binucléaire, (D) Formation du tube pollinique, (F) Sac embryonnaire à l'intérieur de l'ovule, (G) double fécondation, (H) Initiation de la division du zygote principal, (I) Formation de l'embryon et de l'albumen, (J) Semence. 1. Noyaux spermatiques, 2. Cellule oëuf (oosphère), 3. Noyaux polaires de la cellule principale du sac embryonnaire, 4. Zygote principal en division, 5. Embryon en formation, 6. Albumen. (Histoire Naturelle du Pays Catalan, page 51).

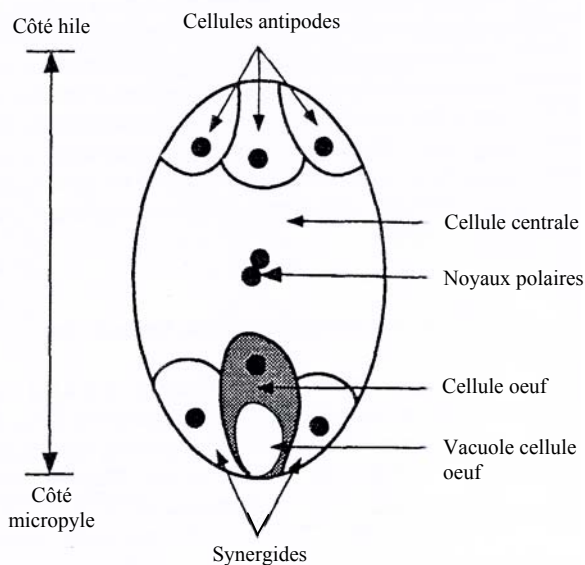


Figure 4 : Organisation du sac embryonnaire. L'orientation de l'axe micropyle-hile est indiqué par la flèche verticale. Le sac embryonnaire est formé de sept cellules et huit noyaux : (i) du côté micropyle (lieu d'entrée du tube pollinique dans le sac embryonnaire), une triade comprenant une grosse cellule centrale, l'oosphère (gamète ♀) et deux cellules latérales, les synergides, (ii) du côté hile, trois cellules antipodes et, (iii) une cellule centrale contenant deux noyaux polaires. (Adaptée de Reiser et Fischer, 1993)

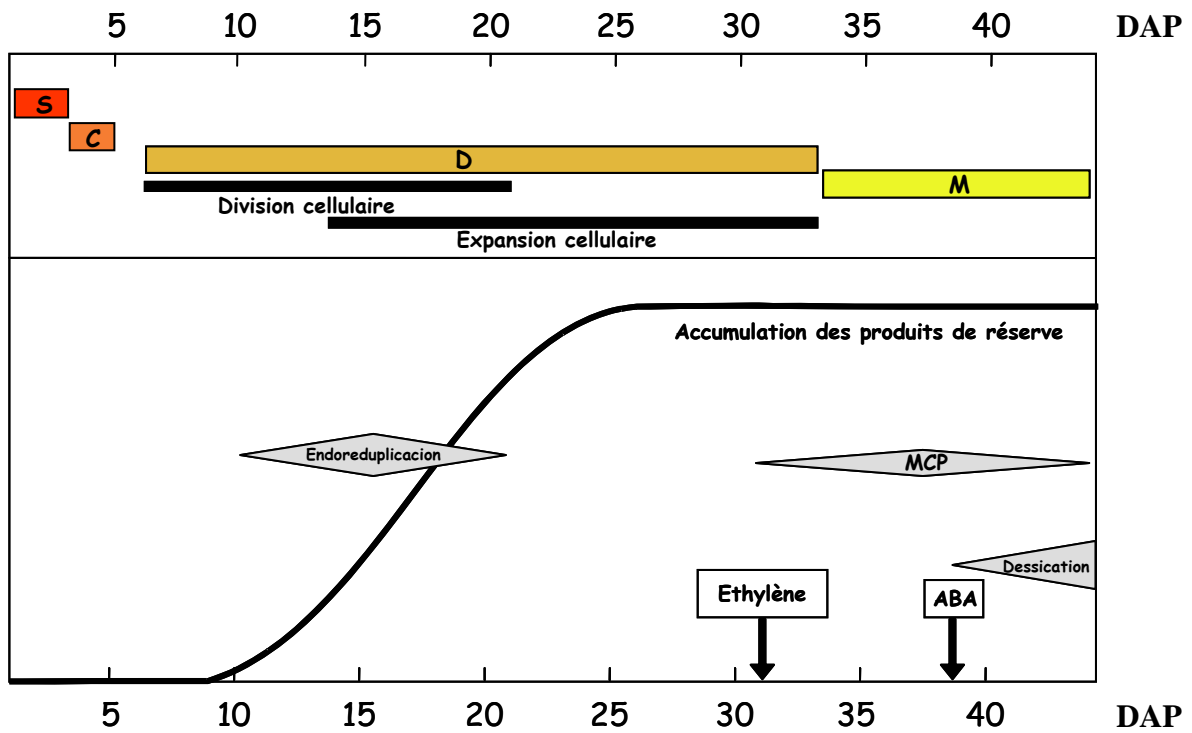


Figure 5 : Principaux processus physiologiques du développement de l'albumen de maïs. Représentation schématique des quatre phases du développement de l'albumen de maïs : (S) syncytium , (C) cellularisation, (D) différenciation et (M) maturation. Jours après pollinisation (DAP), mort cellulaire programmée (MCP), acide abscissique (ABA). (Adaptée de Goldberg *et al.*, 1989).

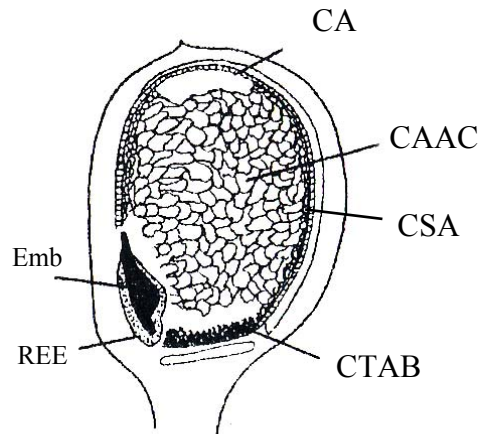


Figure 6 : Diagramme d'une section longitudinale d'un grain de maïs au stade de développement 15 DAP comprenant les cellules aleurones (CA), les cellules subaleurones (CSA), les cellules de l'albumen amylicé central (CAAC), les cellules de transfert de l'albumen basal (CTAB) et la région environnant l'embryon (REE). Emb, embryon. (Adaptée de Olsen, 2001)

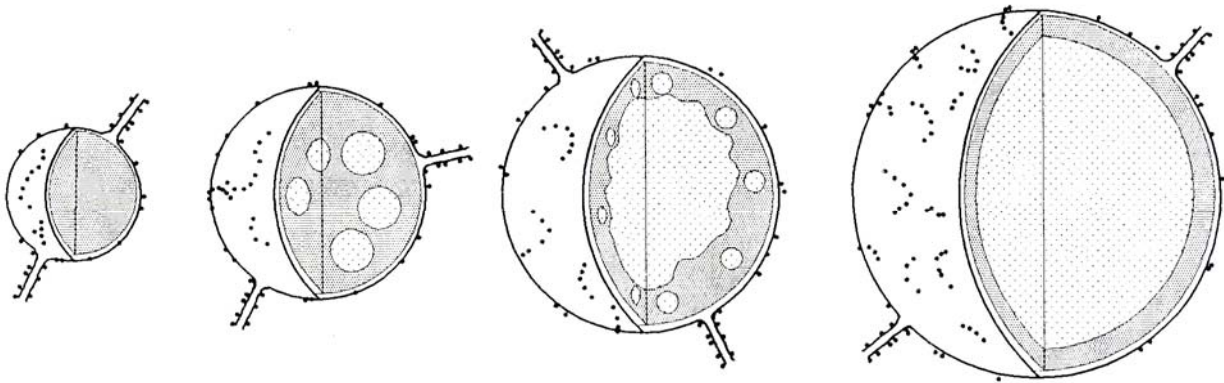


Figure 7 : Représentation schématique du développement des corps protéiques dans l'albumen de maïs. Les régions sombres (pointillés denses) correspondent aux régions riches en β - et γ -zéines, et les régions claires (pointillés parsemés) correspondent aux régions riches en α -zéines. Le corps protéique est entouré par une membrane du réticulum endoplasmique rugueux (les points noirs représentent des ribosomes). (Adaptée de Lending et Larkins, 1989)

Protéines	Sauvage	<i>Opaque-2</i>
Albumines	3 . 2	13 . 2
Globulines	1 . 5	3 . 9
Prolamines (Zéïnes)	47 . 2	22 . 8
γ -zéïne	35 . 1	50 . 0

Tableau 2 : Niveaux relatifs des fractions protéiques dans l'albumen d'un grain de maïs *wt* et *Opaque-2*. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de protéines totales dans l'albumen. (Inglett, 1970).

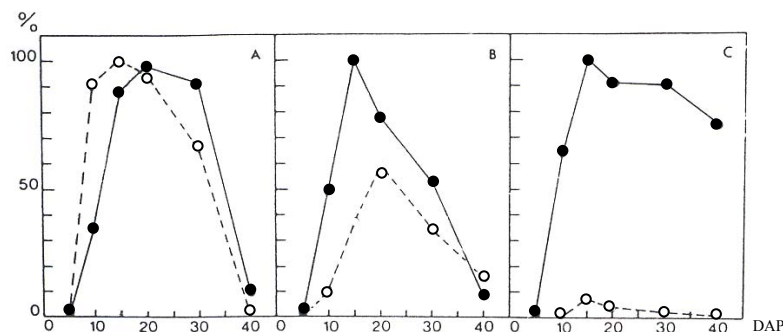


Figure 8 : Accumulation de l'ARNm de trois polypeptides majeurs de l'albumen durant le développement d'un grain de maïs. L'axe des abscisses représente les jours après pollinisation (DAP). Le niveau relatif de chaque transcrit, en % du niveau maximum, est représenté en ordonnée. (A) ARNm de la γ -zéïne de 27 kDa, (B) ARNm de l' α -zéïne de 19 kDa et (C) ARNm de l' α -zéïne de 22 kDa. Géotype sauvage (●) et *Opaque-2* (○). (Pérez-Grau *et al.*, 1986)

GENE (nom du site)	Séquence ADN	Espèce	Référence
Avec ACGT			
α Z 22kDa (Z3)	TCC ACGT AGAT	Maïs	Schmidt <i>et al.</i> , 1992
O2 (O2)	TTG ACGT TGGT	Maïs	Lohmer <i>et al.</i> , 1991
b-32 (B5)	TTG ACGT GAAT	Maïs	Lohmer <i>et al.</i> , 1991
Sans ACGT			
α Z 22kDa (Z1)	TCACATGTGT	Maïs	Schmidt <i>et al.</i> , 1992
α Z 22kDa (Z2)	TCATGCATGT	Maïs	Schmidt <i>et al.</i> , 1992
b-32 (B1)	GATGACATGG	Maïs	Lohmer <i>et al.</i> , 1991
b-32 (B2)	GATGATATGG	Maïs	Lohmer <i>et al.</i> , 1991
b-32 (B3)	GATGATGTGG	Maïs	Lohmer <i>et al.</i> , 1991
b-32 (B4)	GATGACATGA	Maïs	Lohmer <i>et al.</i> , 1991
GCN4 “like”			
LMWG1-D1 (GLM)	TGAGTCATAT	Blé	Holdsworth <i>et al.</i> , 1995

Figure 9 : Hétérogénéité des principaux motifs *cis*-régulateurs reconnus par le facteur de transcription O2. GLM, motif GCN4 « like ».



Figure 10 : Représentation schématique des interactions ADN-protéines et protéines-protéines potentiellement impliquées dans l'activation du gène α -zéine de 22 kDa de maïs (#M55724). Les séquences cores de la boîte prolamine (Pb) et du motif de liaison à l'ADN de la protéine O2 (o2) sont encadrées. La boîte o2 est la cible du facteur de transcription O2 et la boîte prolamine est la cible de la protéine PBF. Les doubles flèches (traits pointillés) représentent l'interaction entre PBF et O2 démontrée *in vitro* (adaptée de Singh, 1998).

PLANTE/GENE	POSITION / BOITE ALBUMEN BIFACTORIELLE				
Maïs		Pb		GLM	
γ-zéine 27kDA	-508/CTGTG	TGCAATG	A-AACA-CG	TGAGTCCT	GCC
Blé					
LMWG1-D1	-308/TGACA	TGTAATG	TTAATAAGG	TGAGTCCT	ATA
Gliadines α/β	-320/TGACC	TGTAATG	TGAATAAGA	TGAGTCCT	GCG
Orge					
Hordéine B	-305/TGACA	TGTAATG	TGAATAAGG	TGAGTCCT	GTA
Hordéine C	-322/TGTAG	TGTAATG	TAAAAAAAA	TGAGTCCT	CAT
Hordéine γ	-302/TGACA	TGTAATG	TGAATAAGA	TGAGTCCT	GCA
Seigle					
sécaline ω	-324/TGTAG	TGTAATG	TAAAAAAAA	TGAGTCCT	CAG
Consensus		TG(T/C)AATG	(N) ₅₋₉	TGAGTCCT	
GCN4 (Levure)					TGAGTCCT

Figure 11 : Alignement des séquences de la boîte albumen bifactorielle des gènes de protéines de réserves de céréales. Les séquences cores conservées des boîtes prolamines (Pb) et GCN4 « like » (GLM) sont encadrées. Les séquences nucléotidiques sont positionnées par rapport au codon d'initiation de la traduction. N, nucléotides variables. Les références et les numéros d'accès des gènes montrés sont : □□□γ-zein 27kDA (Marzábal *et al.*, 1998), #X53514 ; LMWG1D-1 (Colot *et al.*, 1987), #X13306 ; Gliadines α/β (Summer-Smith *et al.*, 1985), #X02539 ; Hordéine B (Ford *et al.*, 1985), #X03103 ; Hordéine C (Muller et Knudsen, 1993), #M36941 ; Hordéine γ, #M36378 ; Sécaline ω (Hull *et al.*, 1991), #X60295.

PLANTES /GENES	Séquences AACA		POSITIONS
Maïs			
γ -zein 27kDA	CA	-AACAAA-T	CCTCT (-452/-439)
Riz			
Glutéline A1	AT	TAACAAACT	CTATC (-80/-65)
Glutéline A2	AT	TAACAAACT	CTATC (-80/-65)
Glutéline A3	AT	TAACAAACT	CTATC (-80/-65)
Glutéline B1	TG	CAACAAACT	ATATC (-76/-61)
Glutéline B2	TG	CAACAAACA	CTATT (-76/-61)
Glutéline B3	TG	CAACAAACT	CTATC (-75/-60)
Orge			
Hordéine B	CT	TAACAA-CC	CACAC (-373/-357)
Itr-1	TC	CAACAA-CT	AACAG (-107/-93)
Consensus AACA (T/C)AACAA(A/-)CT			
GARE (α-amylase)		TAACAAACT	CGG (-144/-132)

Figure 12 : Alignement des motifs *cis*-régulateurs AACA des gènes de protéines de réserves de céréales et du gène d'un inhibiteur trypsinique BTI-Cme (Itr-1) de l'orge. La séquence core conservée du motif AACA est encadrée. Les séquences nucléotidiques sont positionnées par rapport au site d'initiation de la transcription. Les références et les numéros d'accès des gènes montrés sont : $\square\square\square\gamma$ -zein 27kDA (Marzábal *et al.*, 1998, #X53514); Glutéline A1, A2, A3, B1, B2 et B3 (Takaiwa *et al.*, 1996; #L36819, #Y00687, #X54313, #X54314, #X54192 et #X54193 respectivement); Hordéine B (Diaz *et al.*, 2002, #X03103); Itr-1 (Royo *et al.*, 1996; Diaz *et al.*, 2002, #X65875; GARE, élément de réponse à l'acide gibbéréllique (Gubler et Jacobsen, 1992).

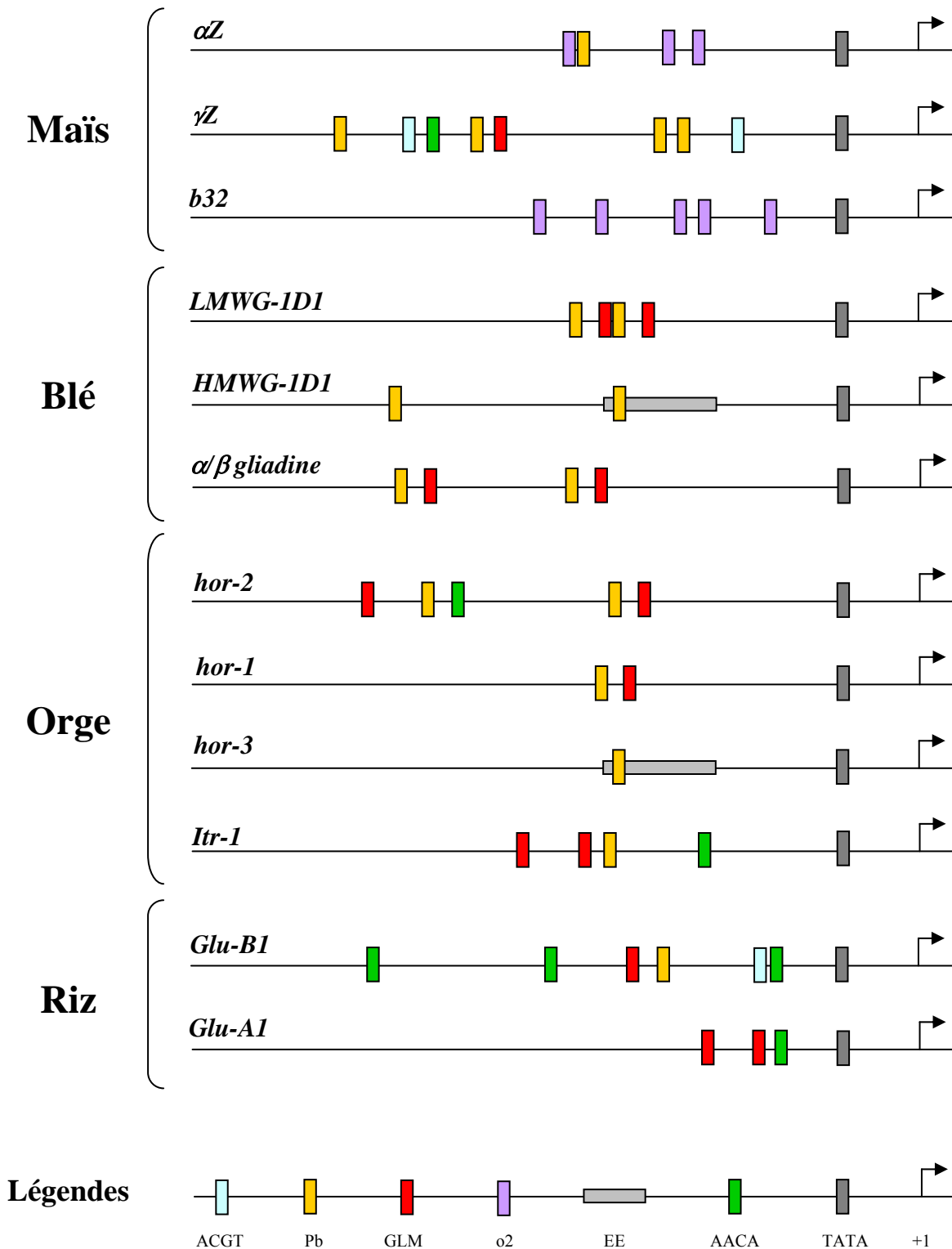


Figure 13 : Représentation schématique de la région proximale (500 pb en amont du site +1 d'initiation de la transcription) des promoteurs de céréales spécifiquement actifs dans le tissu de l'albumen (liste non exhaustive). La boîte TATA et les principaux éléments *cis*-régulateurs identifiés sont montrés ; leur position par rapport au site +1 n'est pas à l'échelle. *αZ*, *α*-zéine de 22 kDa (#M86591, Muth *et al.*, 1996 ; Schmidt *et al.*, 1992) ; *γZ*, *γ*-zéine de 27 kDa (#X53514, Marzábal *et al.*, 1998) ; *b-32* (#54212, Lomher *et al.*, 1991) ; *LMWG-1D1* (#X07747, Hammond-Kosack *et al.*, 1993) ; *HMWG-1D1*, HMWG-Dx5 (#X12928, Thomas et Flavell, 1990) ; *α/β gliadine* (#X02540) ; *hor-2*, B-hordéine (#X87232, Diaz *et al.*, 2002) ; *hor-1*, C-hordéine (#M36941, Carbonero *et al.*, 2000) ; *hor-3*, D-hordéine (#X84368, Shewry *et al.*, 1999) ; *Itr-1*, (#X65875, Diaz *et al.*, 2002) ; *Glu-B1*, glutéline B1 (#X54314, Wu *et al.*, 1998 ; Takaiwa *et al.*, 1996) ; *Glu-A1*, glutéline A1 (#L36819, Takaiwa *et al.*, 1996). Pb, boîte prolamine ; o2, motif Opaque-2 ; GLM, motif GCN4 « like » ; ACGT, boîte G « like » ; EE, élément activateur ; AACA motif AACA

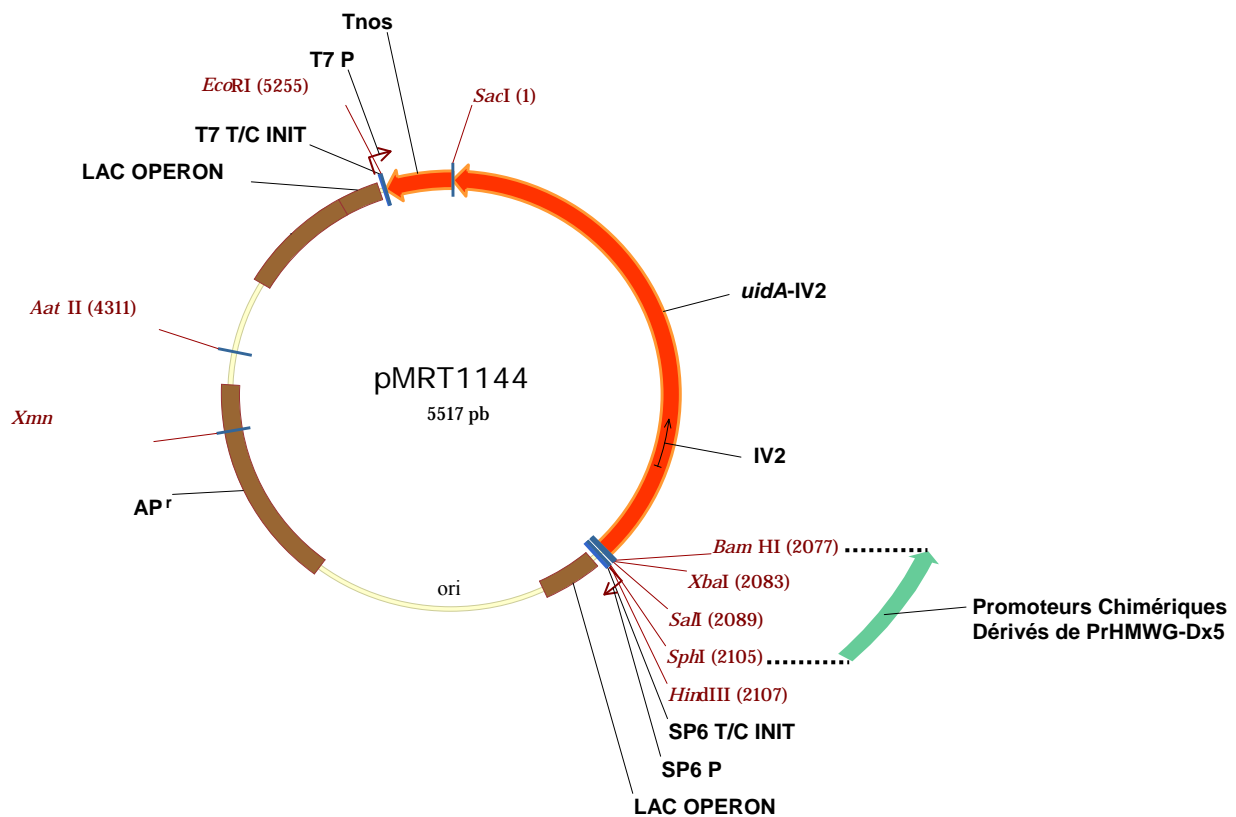


Figure 14 : Représentation schématique (Vecteur NTI) du plasmide pMRT1144, utilisé pour construire les vecteurs d'expression transitoire décrits dans ce travail. Les sites de clonage des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 (flèche verte) sont montrés (traits pointillés). Les principaux sites uniques de restriction sont indiqués. *uidA-IV2*, séquence codante de la β -glucuronidase (*uidA*) incluant l'intron IV2 du gène de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990) ; *Tnos*, terminateur *nos* ; AP^r , région codante de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline ; T7 T/C INIT, site d'initiation de la transcription T7 ; T7 P, promoteur T7 ; SP6 T/C INIT, site d'initiation de la transcription SP6 ; SP6 P, promoteur SP6 ; LAC OPERON, séquence codant la β -galactosidase ; ori, origine de répliation.

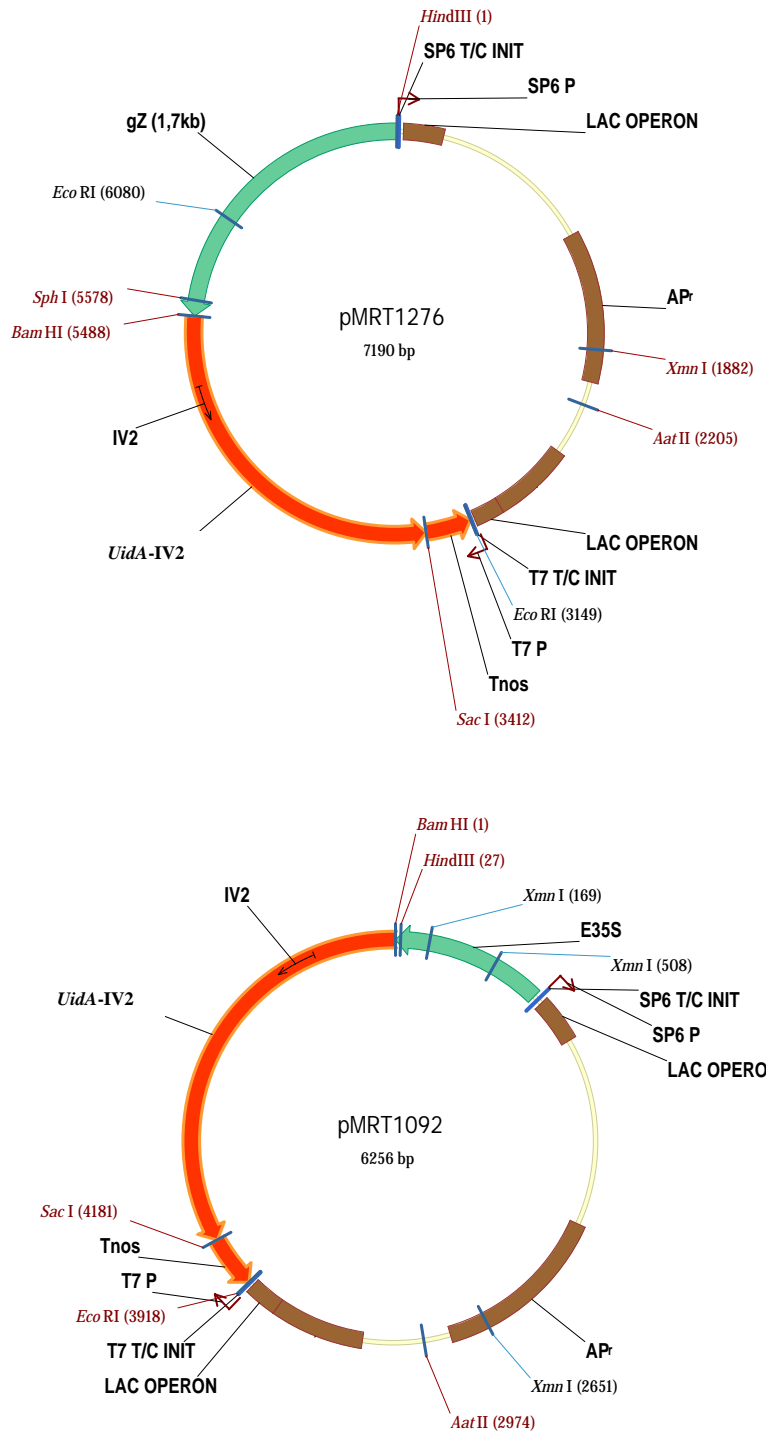


Figure 15 : Représentation schématique (Vecteur NTI) des plasmides pMRT1276 et pMRT1092 utilisés en tant que plasmides de références fortes en expression transitoire dans l'albumen de maïs et dans les feuilles de tabac. Ils comportent respectivement le promoteur γ -zéine entier (γZ) du maïs et le promoteur double 35S (E35S) du CaMV en amont de la séquence *uidA-IV2*. Les sites uniques de restriction sont indiqués en caractères rouge. *uidA-IV2*, séquence codante de la β -glucuronidase (*uidA*) incluant l'intron IV2 du gène de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990) ; *Tnos*, terminateur *nos* ; AP^r , région codante de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline ; T7 T/C INIT, site d'initiation de la transcription T7 ; T7 P, promoteur T7 ; SP6 T/C INIT, site d'initiation de la transcription SP6 ; SP6 P, promoteur SP6 ; LAC OPERON, séquence codant la β -galactosidase ; ori, origine de réplication.

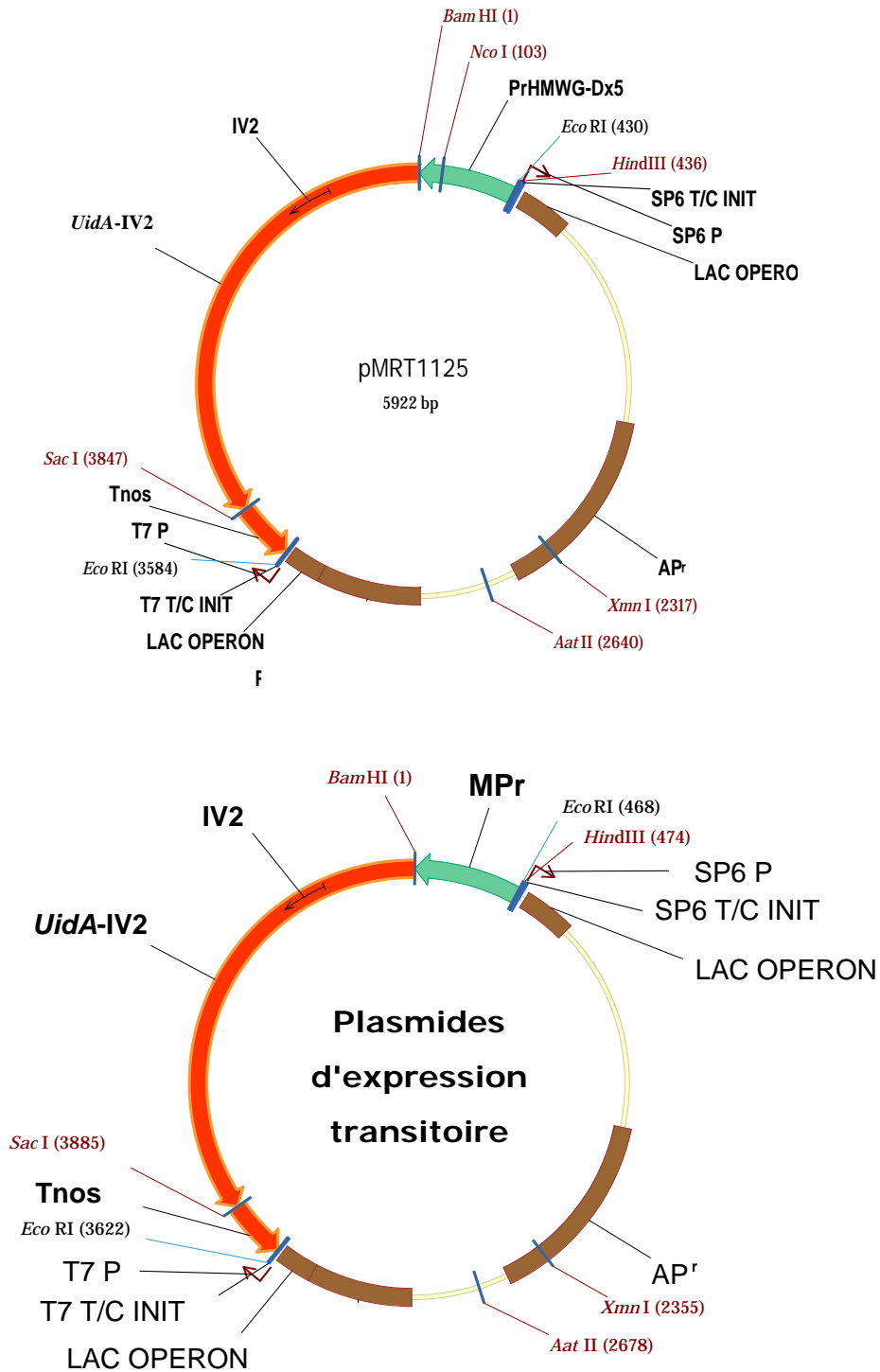


Figure 16 : Représentation schématique (Vecteur NTI) du plasmide pMRT1125 comportant la séquence entière du promoteur HMWG-Dx5 (PrHMWG-Dx5) et des plasmides d'expression transitoire résultant du clonage orienté des différents fragments promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 (extrémités *EcoRI* traitées à la Klenow et *BamHI*) dans les sites de restriction *SphI* (traité à l'ADN polymérase T4) et *BamHI* de pMRT1144. La carte de restriction du plasmide d'expression transitoire est commune à l'ensemble des plasmides d'expression transitoire décrits dans ce travail. Les sites uniques de restriction sont indiqués en caractères rouge. *uidA-IV2*, séquence codante de la β -glucuronidase (*uidA*) incluant l'intron IV2 du gène de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990) ; *Tnos*, terminateur *nos* ; AP^r, région codante de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline ; T7 T/C INIT, site d'initiation de la transcription T7 ; T7 P, promoteur T7 ; SP6 T/C INIT, site d'initiation de la transcription SP6 ; SP6 P, promoteur SP6 ; LAC OPERON, séquence codant la β -galactosidase ; ori, origine de réplication.

Amorces PCR		
Noms (Codes MRT)	Séquences nucléotidiques 5'-3'	Sites de restriction et séquences exogènes incorporés en 5'
P1 (O587)	ATCG GAATTC GTGTTGGCAAAC TGC	<i>EcoRI</i>
P2 (O588)	ATCG GAATTC GCAGACTGTCCAAA AATC	<i>EcoRI</i>
P3 (O589)	ATCG GAATTC CAGAACTAGGATTACGCC G	<i>EcoRI</i>
P4 (O593)	TAC GAATTC CCAGCTTTGAGTGGCC G TAG	<i>EcoRI</i>
P5 (O610)	ATCG GAATTC TAGACGCCGATTACGTGGCTTTAG C	<i>EcoRI</i> et <i>XbaI</i>
P6 (O597)	TAC GAATTC CCTCgacatggttagaagttttgagtg ccgccactactcgacatggttagaagttttgagtg GCCGTAGATTTGC	<i>EcoRI</i> , Boîtes céréales
P7 (O611)	ATCG GAATTC GCCGATTACGTGGCTTTAG C	<i>EcoRI</i>
P8 (O613)	ATCG GAATTC GCAGCCATGGTCTGA ACC	<i>EcoRI</i>
P11 (O615)	TAC GAATTC CCTCGACAT G	<i>EcoRI</i>
P3m (O1003)	ATCG GAATTC CAGAACTAGGATTACGCCGATTCTC TGGCTTTAGCAGACTGT CC	<i>EcoRI</i>
RP1 (O590)	TAC GGATCCC CGGGATCTCTAGTTTGTGGT G C	<i>BamHI</i>
RP7 (O612)	G CTCTAGAC CAACACAAAAGAAGCT G	<i>XbaI</i>
RP8 (O614)	CAT GCCATGG CCAACACAAAAGAAGCT G	<i>NcoI</i>
RP11 (O617)	G CTCTAGAG CAAATCTACGGCCACT C	<i>XbaI</i>
RP_{s1} (O594)	tgcgtcatcccttacgtcagtgagatatcacatc aatCACGGTGAGGTTTGTTTAGCCTA A G	as-2/as-1
Ps₁ (O596)	attgatgtgatatctccactgacgtaagggatgac gcaCACGCAGCCATGGTCCTGAACCT T C	as-2/as-1
RP_{s2} (O592)	tgcgtcatcccttacgtcagtgagatatcacatc aatcttgatatcacatcaatCACGGTGAGGTTTGT TTAGCCTA A G	as-2/as-2/as-1
Ps₂ (O595)	attgatgtgatatcaagattgatgtgatatctcca ctgacgtaagggatgacgcaCACGCAGCCATGG T C CTGAACCT T C	as-2/as-2/as-1

Tableau 3 : Séquences nucléotidiques 5'-3' des amorces ADN utilisées lors de la synthèse par PCR des promoteurs synthétiques dérivés de HMWG-Dx5. Les sites de restriction (caractères gras) et les séquences exogènes au promoteur HMWG-Dx5 (lettres minuscules) incorporés en 5' sont indiqués.

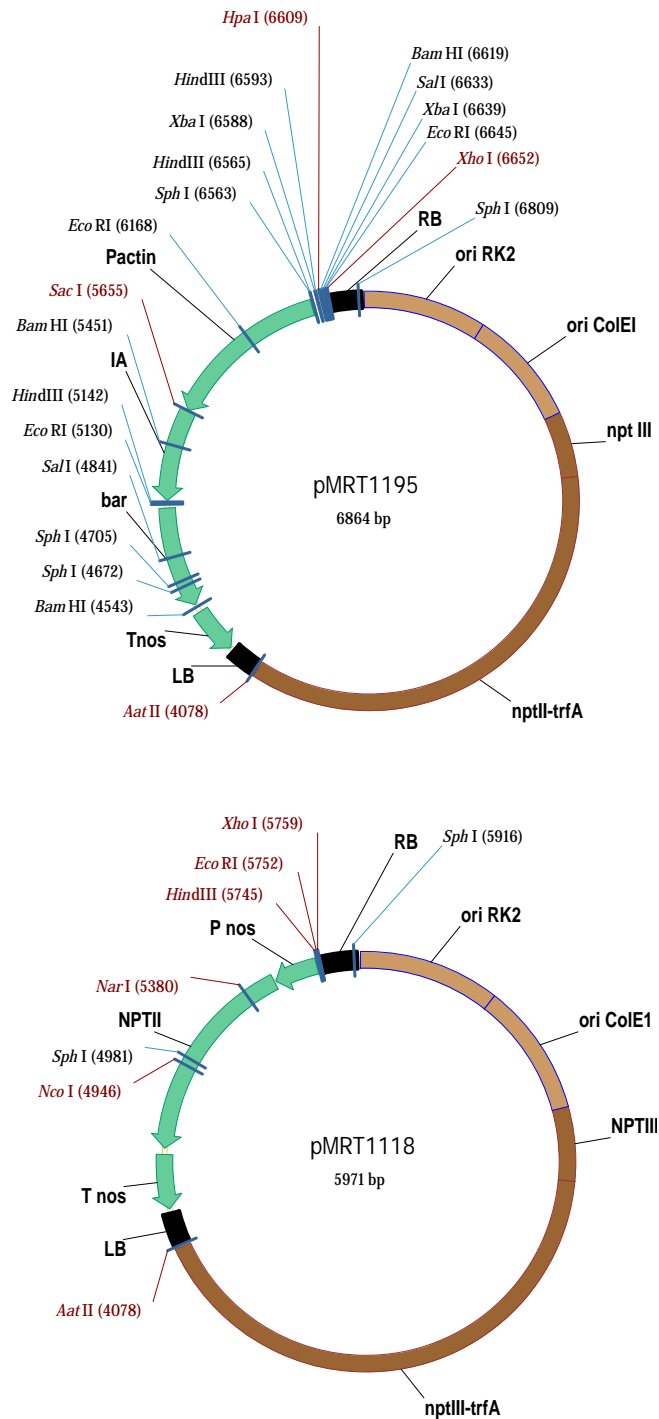


Figure 17 : Représentation schématique (Vecteur NTI) des plasmides binaires pMRT1195 et pMRT1118, respectivement employés pour la construction des plasmides binaires utilisés pour la transformation stable du maïs et du tabac. Les sites uniques de restriction sont indiqués en caractères rouge. *Pnos*, promoteur *nos* ; *Pactin*, promoteur actine de riz ; *IA*, intron actine de riz ; *bar*, gène *bar* qui confère aux plants de maïs et de tabac la résistance au BASTA ; *nptII*, gène de la néomycine phosphotransférase II qui confère aux plants de tabac la résistance à la kanamycine ; *Tnos*, terminateur *nos* ; *RB* et *LB*, bordures droite et gauche de l'ADN-T issues du plasmide pTiT37 ; *nptIII*, gène de la néomycine phosphotransférase III qui confère aux cellules procaryotes hôtes la résistance à la kanamycine ; *oriRK2*, origine de réplcation à large spectre d'hôte provenant du réplicon RK2 d'*E. coli*, instable et à faible nombre de copies ; *ori ColE1*, origine de réplcation d'*E. coli* ; *trfA*, locus permettant la production des protéines p285 et p382 qui améliore le taux de réplcation du plasmide.

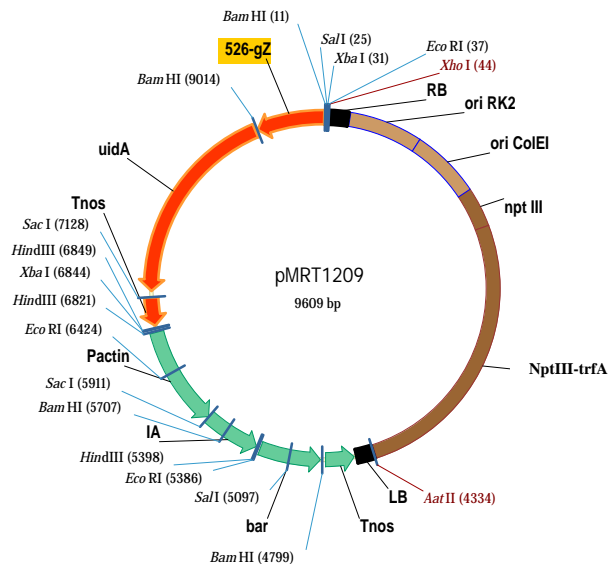
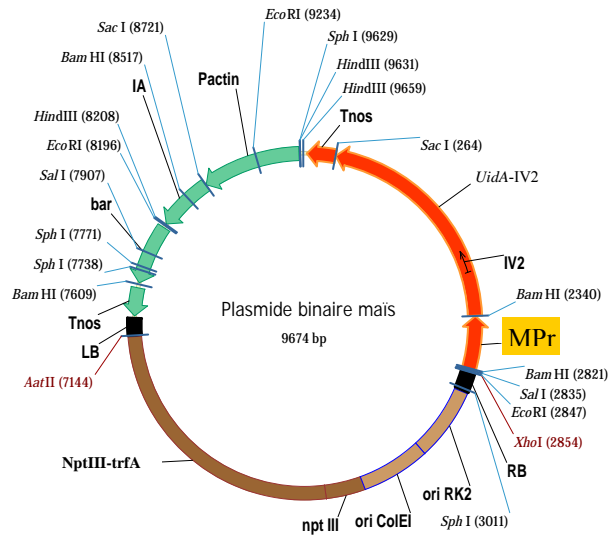


Figure 18 : Représentation schématique (Vecteur NTI) des plasmides binaires utilisés pour la transformation stable du maïs. Ils résultent du clonage d'une cassette d'expression d'intérêt au site *HpaI* de pMRT1195 (Voir stratégies de clonage). Les sites uniques de restriction sont indiqués en caractères rouge. MPr, promoteur chimérique dérivé de PrHMWG-Dx5 ; *uidA-IV2*, séquence codant la β -glucuronidase (*uidA*) incluant l'intron IV2 du gène de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990) ; Pactin, promoteur actine de riz ; IA, intron 1 de l'actine de riz ; *bar*, gène *bar* qui confère aux plants de maïs et de tabac la résistance au BASTA ; *Tnos*, terminateur *nos* ; RB et LB, bordures droite et gauche de l'ADN-T issues du plasmide pTiT37 ; *nptIII*, gène de la néomycine phosphotransférase III qui confère aux cellules procaryotes hôtes la résistance à la kanamycine ; *oriRK2*, origine de répllication à large spectre d'hôte provenant du réplicon RK2 d'*E. coli*, instable et à faible nombre de copies ; *ori ColE1*, origine de répllication d'*E. coli* ; *trfA*, locus permettant la production des protéines p285 et p382 qui améliore le taux de répllication du plasmide.

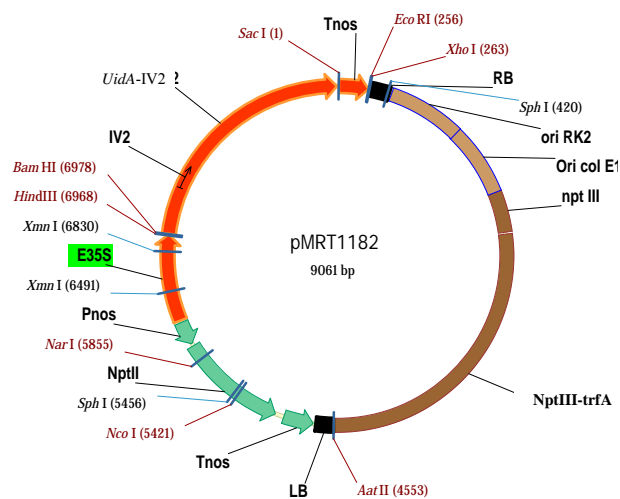
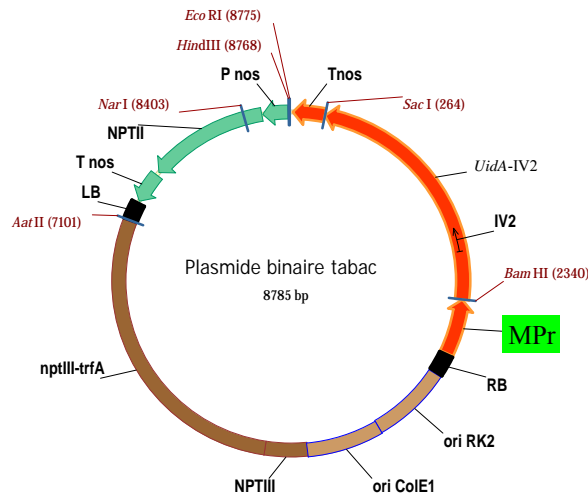


Figure 19 : Représentation schématique (Vecteur NTI) des plasmides binaires utilisés pour la transformation stable du tabac. Ils résultent du clonage d’une cassette d’expression d’intérêt au site *Xho*I de pMRT1118 (Voir stratégies de clonage). Les sites uniques de restriction sont indiqués en caractères rouge. MPr, promoteur chimérique dérivé de PrHMWG-Dx5 ; *uidA-IV2*, séquence codant la β -glucuronidase (*uidA*) incluant l’intron IV2 du gène de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990) ; *Pnos*, promoteur *nos* ; *nptII*, gène de la néomycine phosphotransférase II qui confère aux plants de tabac la résistance à la kanamycine ; *Tnos*, terminateur *nos* ; RB et LB, bordures droite et gauche de l’ADN-T issues du plasmide pTiT37 ; *nptIII*, gène de la néomycine phosphotransférase III qui confère aux cellules procaryotes hôtes la résistance à la kanamycine ; *oriRK2*, origine de réplcation à large spectre d’hôte provenant du réplicon RK2 d’*E. coli*, instable et à faible nombre de copies ; *ori ColE1*, origine de réplcation d’*E. coli* ; *trfA*, locus permettant la production des protéines p285 et p382 qui améliore le taux de réplcation du plasmide.

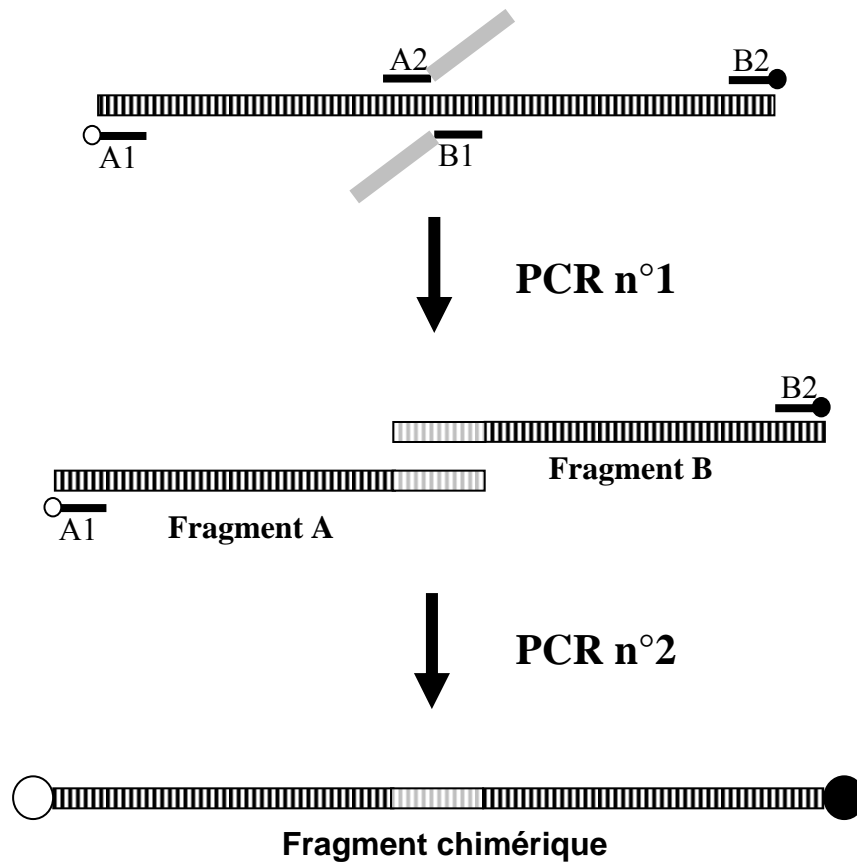


Figure 20 : Représentation schématique de la technique SOE (« splicing overlap extension »). Les fragments A et B, localisés de part et d'autre du point de fusion de la séquence étrangère, sont respectivement synthétisés à l'aide des couples d'amorce A1/A2 et B1/B2 lors d'une première réaction PCR. La séquence d'origine est utilisée en qualité d'ADN matrice et la séquence exogène est fusionnée en 5' des amorces A2 et B1. Le fragment d'ADN chimérique est obtenu lors d'une extension par chevauchement (PCR n°2) en présence des fragments A et B complémentaires au niveau de la séquence exogène et à l'aide des amorces A1 et B2. La séquence d'origine (trait noir), la séquence exogène (trait gris) et les sites de restriction EcoRI (cercles blancs) et BamHI (cercles noirs) respectivement incorporés en 5' des amorces A1 et B2 sont représentés.

Clonages cohésifs	
Les deux extrémités du vecteur et de l'insert sont cohésives	
Fragment vecteur	100ng
Fragment insert	50ng
Tampon de la T4 ADN ligase (10X)	1X
T4 ADN ligase	400U
H ₂ O	qsp 10 μ L

Clonages semi-cohésifs	
Le vecteur et l'insert présentent chacun une extrémité cohésive et une extrémité franche	
Fragment vecteur	50ng
Fragment insert	100ng
Tampon de la T4 ADN ligase (10X)	1X
T4 ADN ligase	400U
H ₂ O	qsp 10 μ L

Clonages bouts francs	
Les deux extrémités du vecteur et de l'insert sont franches	
Fragment vecteur	10ng
Fragment insert	100ng
Tampon de la T4 ADN ligase (10X)	1X
T4 ADN ligase	400U
H ₂ O	qsp 10 μ L

Tableau 4 : Ratios ADN vecteur et ADN insert utilisés lors des clonages de l'ADN plasmidique.

Milieu LB liquide	
Select Peptone 140	10g/L
Select Yeast Extract	5g/L
NaCl	10g/L
pH 7,2	
Autoclavage	

Milieu 2YT liquide	
Select Peptone 140	10g/L
Select Yeast Extract	10g/L
NaCl	5g/L
pH 7,2	
Autoclavage	

Milieu LB solide	
Select Peptone 140	10g/L
Select Yeast Extract	5g/L
NaCl	10g/L
pH 7,2	
Agar-agar	15g/L
Autoclavage	

Milieu 2YT solide	
Select Peptone 140	10g/L
Select Yeast Extract	10g/L
NaCl	5g/L
pH 7,2	
Agar-agar	15g/L
Autoclavage	

Tableau 5 : Composition des milieux de culture utilisés en bactériologie.

Milieu BY3	
M-5519 (Sigma)	4,4g/L
Myoinositol	100mg/L
Thiamine	1mg/L
KH ₂ PO ₄	200mg/L
Saccharose	30g/L
Sorbitol	45,5g/L
pH 5,8	
Agar purifié	8g/L
Autoclavage	
2,4-D	1mg/L

Tableau 6 : Composition du milieu de plasmolyse douce BY3 utilisé lors de la transformation transitoire des feuilles de tabac par biolistique.

Milieu LSinf	
M6899 (Sigma)	4.43g/L
Vitamines (X1000) *	1X
Hydrolysate de caséine	1g/L
2,4-D (1mg/mL)	1,5mg/L
Saccharose (ultra pure)	68,5g/L
Glucose	36g/L
pH 5,2	
Filtration 0.2µm	

Milieu 1,5LSAs (coculture)	
M6899 (Sigma)	4,43g/L
Vitamines (X1000) *	1X
L-proline	700mg/L
2,4-D (1mg/mL)	1,5mg/L
Saccharose (ultra pure)	20g/L
Glucose	10g/L
MES	500mg/L
pH 5,8	
Agar purifié	8g/L
Autoclavage	
Acétosyringone (0.1M)	0,1mM/L

Milieu LSD5	
M6899 (Sigma)	4,43g/L
Vitamines (X1000) *	1X
L-proline	700mg/L
2,4-D (1mg/mL)	1,5mg/L
Saccharose (ultra pure)	30g/L
MES	500mg/L
pH 5,8	
Agar purifié	8g/L
Autoclavage	
Acétosyringone (0.1M)	0,1mM/L
AgNO ₃	8mg/L
Céfotaxime	250mg/L
Glufosinate	5 mg/L

Milieu LSD10	
M6899 (Sigma)	4,43g/L
Vitamines (X1000) *	1X
L-proline	700mg/L
2,4-D (1mg/mL)	1,5mg/L
Saccharose (ultra pure)	30g/L
MES	500mg/L
pH 5,8	
Agar purifié	8g/L
Autoclavage	
Acétosyringone (0.1M)	0,1mM/L
AgNO ₃	8mg/L
Céfotaxime	250mg/L
Glufosinate	10mg/L

Milieu LSZ	
M6899 (Sigma)	4,43g/L
Vitamines (X1000) *	1X
L-proline	700mg/L
2,4-D (1mg/mL)	1,5mg/L
Saccharose (ultra pure)	30g/L
MES	500mg/L
pH 5,8	
Agar purifié	8g/L
Autoclavage	
Zéatine	3mg/L
Céfotaxime	250mg/L
Glufosinate	5mg/L

Tableau 7 : Composition des milieux de culture utilisés lors de la transformation stable du maïs par *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitamines (X1000) : 0,5mg/mL d'acide nicotinique, 0,5mg/mL de pyridoxine, 0,6mg/mL de thiamine, filtration (0,2µm) et stockage à -20°C.

Milieu MS-30 liquide	
MS-0404 (Sigma)	4,4g/L
Saccharose	30g/L
pH 5,7	
Autoclavage	

Milieu MC-solide	
MS-0404 (Sigma)	4,4g/L
Saccharose	30g/L
pH 5,7	
Agar-agar	8g/L
Autoclavage	
Benzyl Amino Purine (BAP)	1mg/L
Acide Indole-3 Acétique (ANA)	0,1mg/L

Milieu de régénération	
MS-0404 (Sigma)	4,4g/L
Saccharose	30g/L
pH 5,7	
Agar-agar	8g/L
Autoclavage	
Benzyl Amino Purine (BAP)	1mg/L
Acide Indole-3 Acétique (ANA)	0,1mg/L
Augmentin	400mg/L
Kanamycine (Glufosinate*)	200mg/L (5mg/L)

Milieu de développement	
MS-0404 (Sigma)	4,4g/L
Saccharose	20g/L
pH 5,7	
Agar-agar	8g/L
Autoclavage	
Augmentin	400mg/L
Kanamycine (Glufosinate*)	100mg/L (5mg/L)

Tableau 8 : Composition des milieux de culture utilisés lors de la transformation stable du tabac par *Agrobacterium tumefaciens*. * Le glufosinate a été substitué à la kanamycine pour la sélection des plants de tabac transformés par A1238, agrobactérie recombinante dans laquelle a été intégré le plasmide binaire pMRT1231 porteur du gène de sélection bar.

Tampon X-Gluc	
NaH ₂ PO ₄	33,3mM
Na ₂ HPO ₄	66,6mM
5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl glucuronide	500mg/L
Triton X100	0,05% (V/V)
pH 7,0, autoclavage, conservation à -20°C	

Tableau 9 : Tampon de coloration histochimique utilisé pour visualiser l'activité β -glucuronidase.

Tampon A	
Hepes	10mM
KCl	10mM
MgCl ₂	10mM
EDTA	5mM
Triton (X100)	0,5% (v/v)
Sucrose	250mM
DTT *	1mM
Inhibiteurs de protéases P9599 (Sigma) *	4mL/L
pH 7,8, filtration 0.2µm	

Tampon LSB (Low salt buffer)	
Hepes	20mM
KCl	20mM
MgCl ₂	1,5mM
Glycérol (98%)	25% (v/v)
EDTA	200µM
DTT *	500µM
Inhibiteurs de protéases P9599 (Sigma) *	4mL/L
pH 7,8, filtration 0.2µm	

Tampon HSB (High salt buffer)	
Hepes	20mM
KCl	1M
MgCl ₂	1,5mM
Glycérol (98%)	25% (v/v)
EDTA	200µM
DTT *	500µM
Inhibiteurs de protéases P9599 (Sigma) *	2mL/L
pH 7,8, filtration 0.2µm	

Tampon B	
Hepes	20mM
KCl	100mM
Glycérol (98%)	10% (v/v)
EDTA	200µM
DTT *	500µM
Inhibiteurs de protéases P9599 (Sigma) *	0,6mL/L
pH 7,8, filtration 0.2µm	

Tableau 10 : Composition des tampons utilisés pour l'extraction des protéines nucléaires de l'albumen de maïs et des feuilles de tabac.

Tampon d'hybridation (8X)	
Tris-HCl	536mM
MgCl ₂	104mM
EDTA	10,4mM
Spermidine	10,4mM
DTT	53,6mM

Tableau 11 : Composition du tampon d'hybridation de deux oligonucléotides complémentaires.

Tampon de liaison (EMSA, 5X)	
Hepes	125mM
KCl	375mM
MgCl ₂	25mM
Glycérol (98%)	50% (v/v)
EDTA	2,5mM
DTT	2,25mM
pH 7,8, filtration 0.2µm	

Tableau 12 : Tampon de liaison utilisé lors des expériences de retard sur gel (EMSA).

Gels de polyacrylamide non dénaturant (5%)	
Acrylamide 30%	7,5mL
TBE (5X)	4,5mL
H ₂ O	33mL
APS 10% (p/v)	105µl
Temed	300µL

Tableau 13 : Composition des gels de polyacrylamide 5% non dénaturants utiliser pour séparer les complexes ADN-protéines.

```

tgctggaaat ccaactacat gacaagcaac aaaacctgaa atgggcttta
ggagttatca atttacttgt tccatgcagg ctaccttcca ctactcgaca
-378
tgcttaga*ag ctttgagtgg ccgtagattt gcaaaagcaa tggctaacag
                                     Pb2

acacatattc tgccaaaccc caagaaggat aatcactttt cttagataaa
                                     Motif          Motif
                                     GATA           GATA

aaagaacaga ccaatataca aacatccaca cttctgcaaa caatacatca

gaactaggat tacgccgatt acgtggcttt agcagactgt ccaaaaatct
                                     Boîte G « like »

gttttgcaaa gctccaattg ctccttgctt atccagcttc ttttgtgtt
    Pb1          Boîte E

gcaaactgcg cttttccaac cgattttggt cttctcgcgc tttcttctta

ggctaaacaa acctcacctg gcacgcagcc atggtcctga accttcacct
    Motif aaca

cgtcccttata aagcctagc caaccttcac aatcttatca tcaccacaa
    TATA
                                     +39
caccgagcac cacaactag agatcaattc actgatagtc caccgagATG
                                     *
                                     +62
                                     *

```

Figure 21 : Séquence nucléotidique partielle de la région 5' proximale du gène HMWG-Dx5 de blé. La séquence s'étendant des nucléotides -378 à +39 (caractères gras) constitue la séquence promotrice de référence (PrHMWG-Dx5, #X12928), utilisée pour construire et étudier l'ensemble des promoteurs synthétiques décrits dans ce manuscrit. La boîte TATA et les principaux éléments *cis*-activateurs putatifs sont encadrés. La séquence conservée de l'élément activateur (« enhancer ») décrit par Thomas et Flavell (1990) dans le promoteur HMWG-Dy10 est soulignée. Les positions nucléotidiques sont données par rapport au site d'initiation de la transcription (+1, flèche). Pb1 et Pb2, boîtes prolamines 1 et 2.

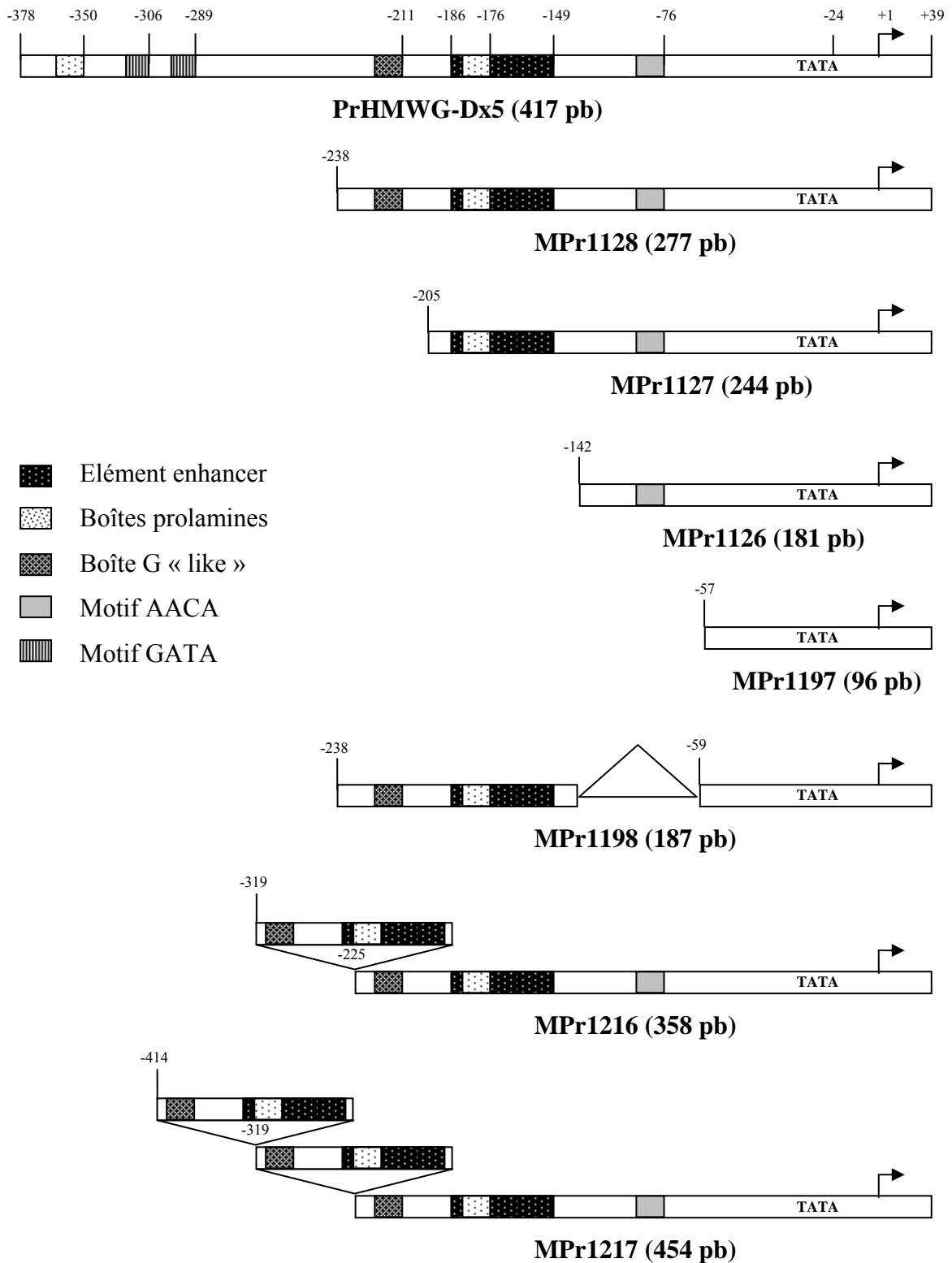


Figure 22 : Représentation schématique du promoteur HMWG-Dx5 (PrHMWG-Dx5) et des promoteurs synthétiques dérivés (MPr). Les positions nucléotidiques sont données par rapport au site d'initiation de la transcription (+1, flèche). La taille de chaque promoteur est donnée en nombre de paires de bases (pb). MPr1183, lequel n'est pas schématisé, est identique à MPr1128 excepté qu'un site *Xba*I a été fusionné à l'extrémité 5'.

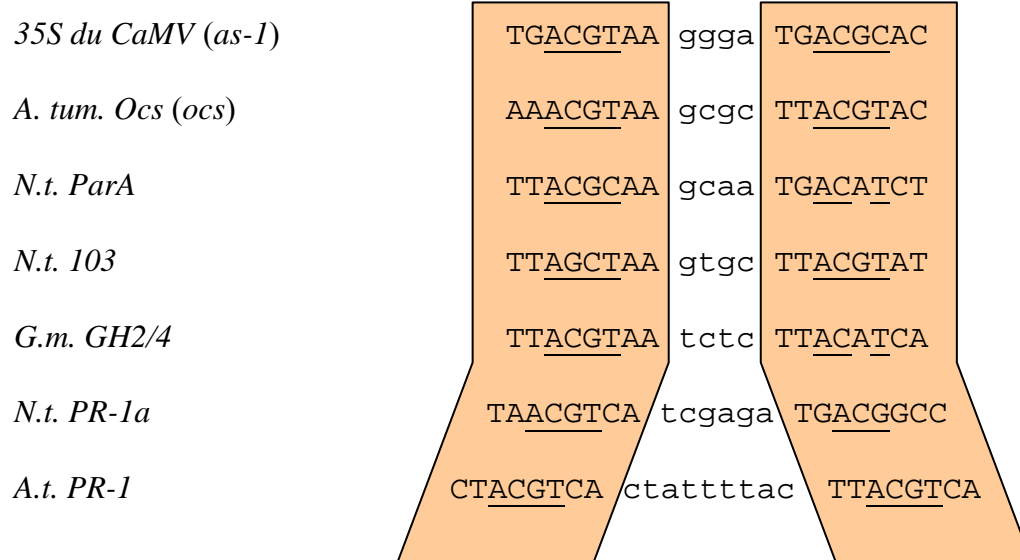


Figure 23 : Alignement de l'élément as-1 du promoteur 35S du CAMV (as-1, Lam *et al.*, 1989) avec les éléments as-1 « like » identifiés dans le promoteur *ocs* localisé sur l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* (*ocs*, Bouchez *et al.*, 1989) et dans les promoteurs de gènes de plantes (*ParA*, Takahashi *et al.*, 1991, Sakai *et al.*, 1998 ; *NT103*, Van der Zaal *et al.*, 1991 ; *GH2/4*, Ulmasov *et al.*, 1994 ; *PR-1a*, Strompen *et al.*, 1998 ; *PR-1*, Zhang *et al.*, 1999). Les deux motifs caractéristiques des éléments as-1 « like » sont encadrés et la séquence correspondante est indiquée en lettres capitales ; la séquence intermédiaire (« spacer ») est donnée en lettres minuscules. Les séquences cores ACGT et ACGC caractéristiques du consensus sont soulignées ; l'interruption du trait indique la présence d'un nucléotide non conservé.

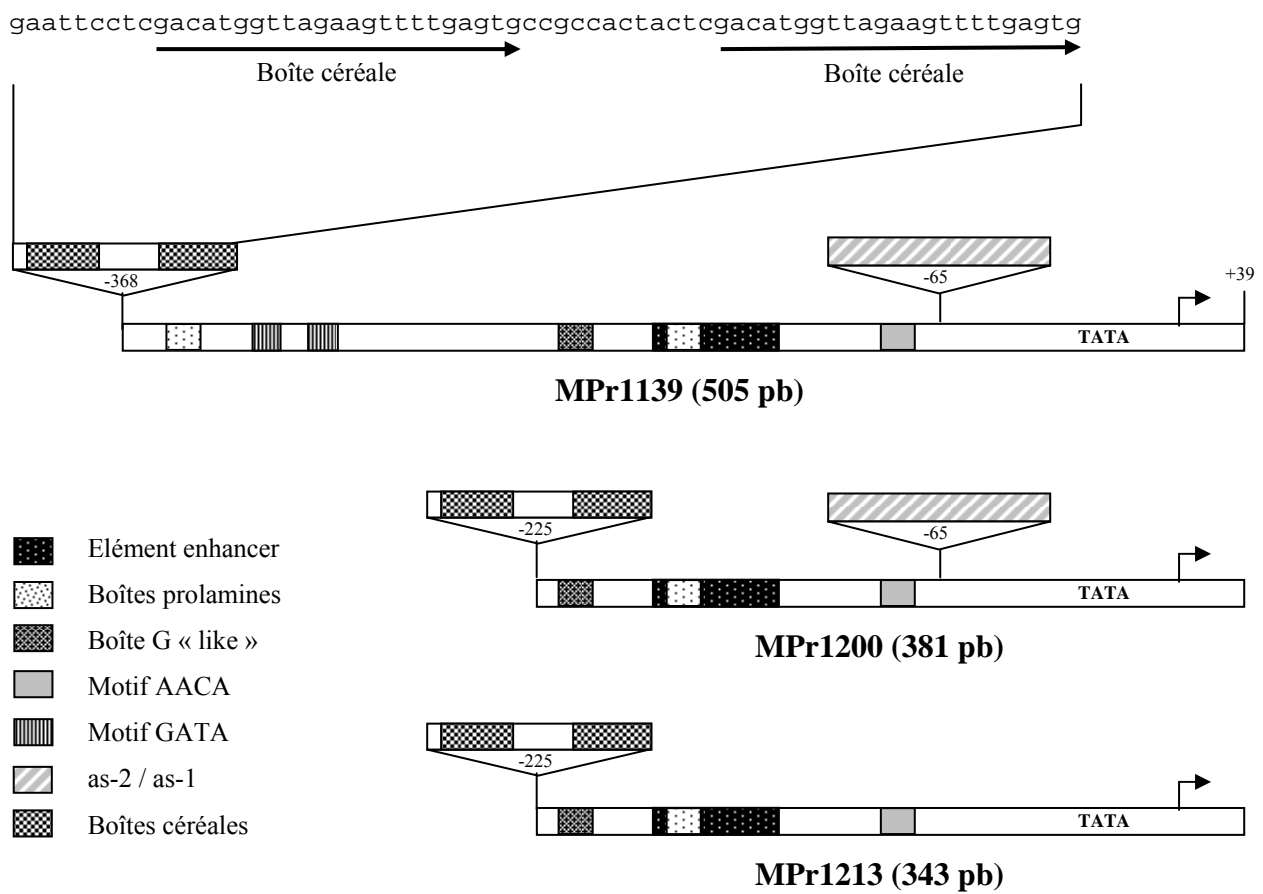


Figure 25 : Représentation schématique des promoteurs chimériques MPr1139, MPr1200 et MPr1213 dérivés de PrHMWG-Dx5. La séquence nucléotidique des boîtes céréales du promoteur HMWG-Bx7 de blé est donnée et le motif core est souligné. Les positions nucléotidiques sont données par rapport au site d'initiation de la transcription (+1, flèche). La taille de chaque promoteur est donnée en nombre de paires de bases (pb).

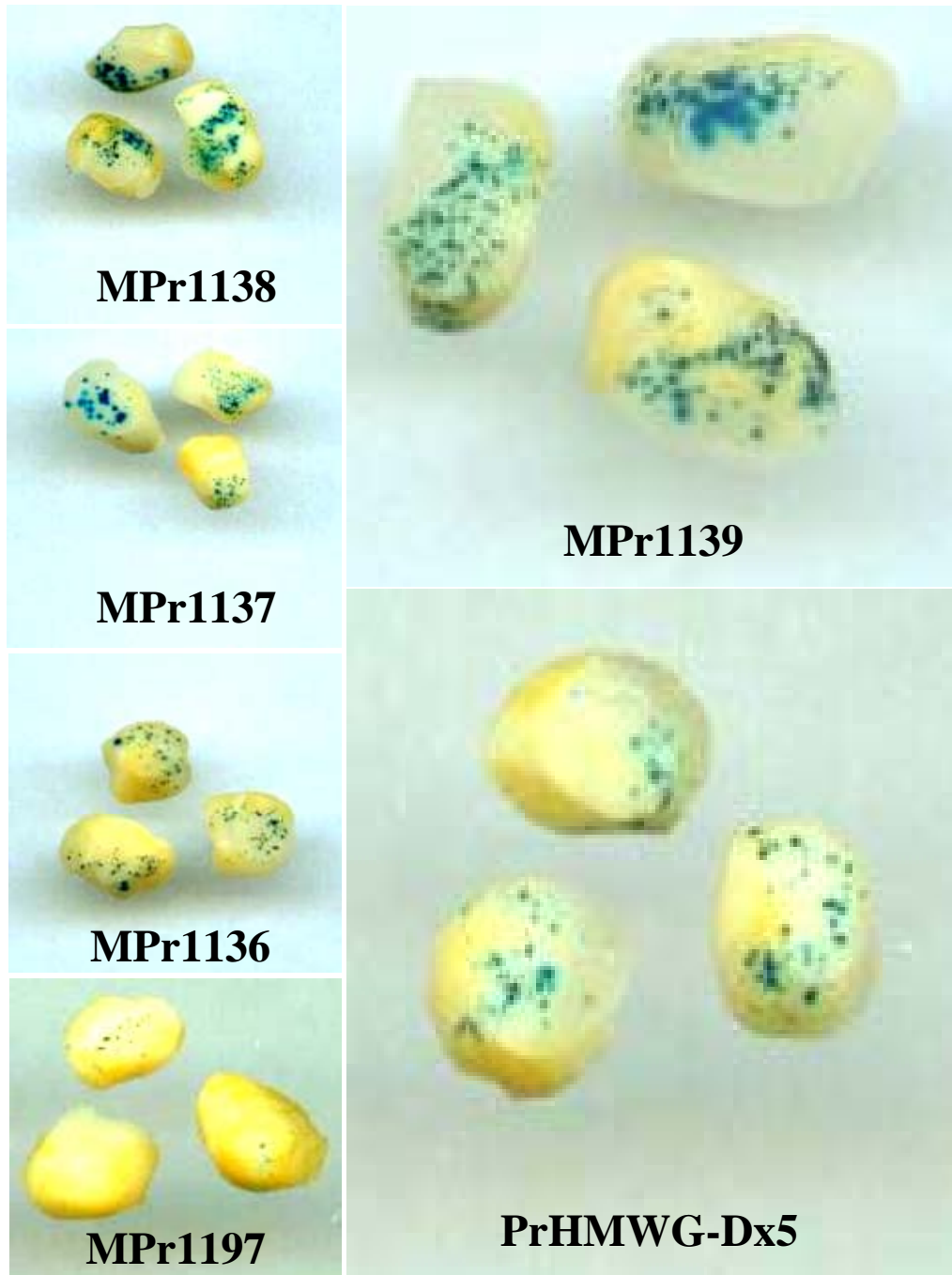


Figure 26 : Visualisation histochimique de l'activité β -glucuronidase dirigée par les promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5, représentatifs de l'activité observée dans chaque catégorie de promoteurs, et PrHMWG-Dx5 original en expression transitoire dans l'albumen de maïs L2 au stade de développement 12 DAP.

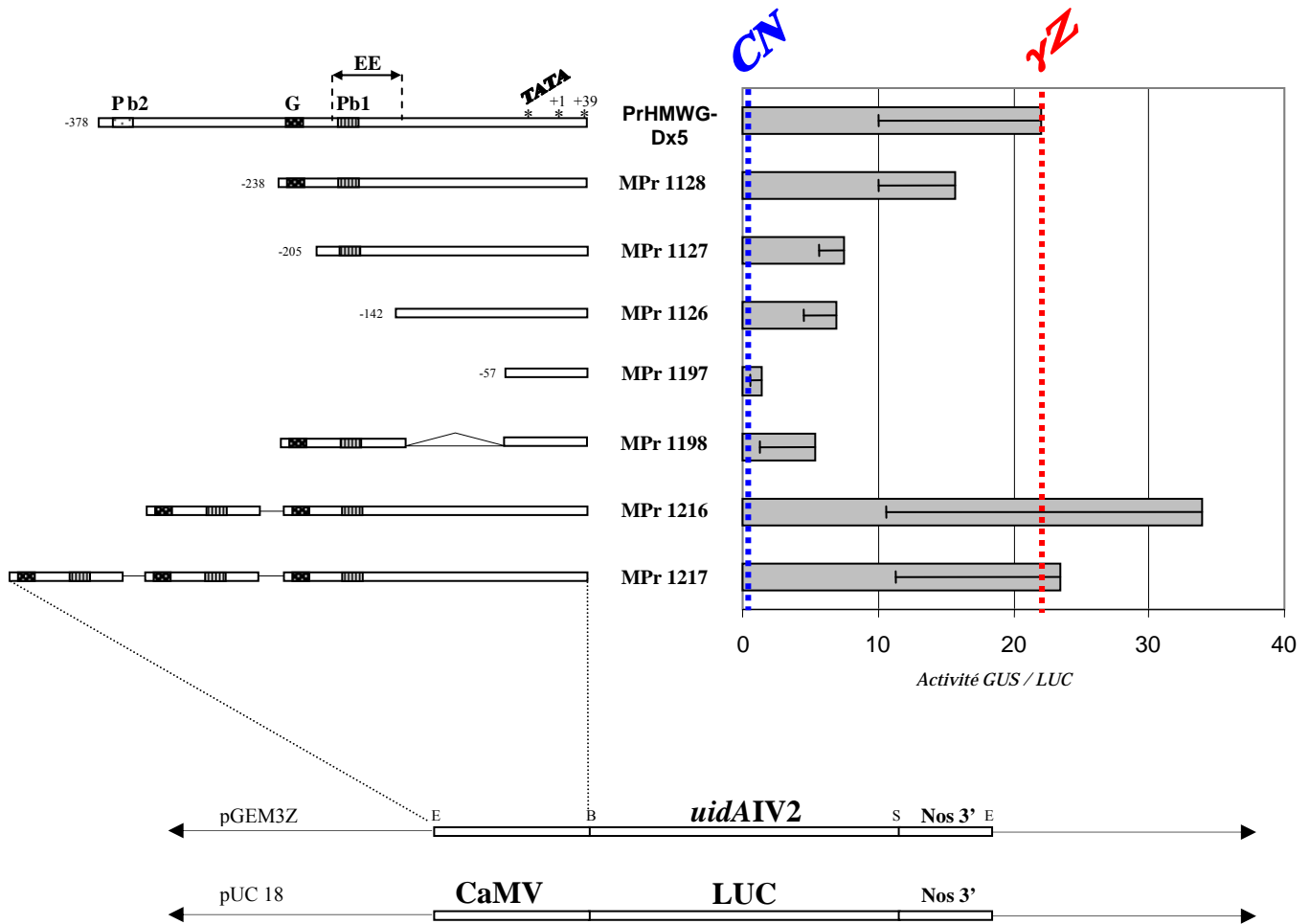


Figure 27 : Analyse fonctionnelle détaillée du promoteur HMWG-Dx5 en expression transitoire dans l'albumen de maïs au stade de développement 12 DAP.

A gauche : représentation schématique des promoteurs HMWG-Dx5 (PrHMWG-Dx5) et des promoteurs HMWG-Dx5 dérivés (MPr). La boîte TATA, le site d'initiation de la transcription (+1) et la position des délétions de l'extrémité 5' sont indiqués. Les éléments *cis*-régulateurs putatifs, l'élément enhancer (EE, -186/-149), les boîtes prolamines (Pb1, -182/-176; Pb2, -357/-350) et la boîte G « like » (G, -218/-211) sont montrés.

A droite : activité transcriptionnelle des promoteurs correspondants dans l'albumen de maïs transformé transitoirement. Les valeurs représentent la moyenne d'au moins cinq expériences indépendantes et correspondent au rapport GUS/LUC. La barre d'erreur indique la déviation standard de la moyenne. Les activités moyennes dirigées par le promoteur de référence de la γ -zéine entier (γ Z; 1,7 kb) et la construction sans promoteur pMRT1144 (CN, contrôle négatif) sont montrées (traits pointillés rouge et bleu respectivement).

En bas : représentation schématique de la construction LUC utilisée comme contrôle interne de transformation. Les sites de restriction *Eco*RI (E), *Bam*HI (B) and *Sac*I (S) sont indiqués.

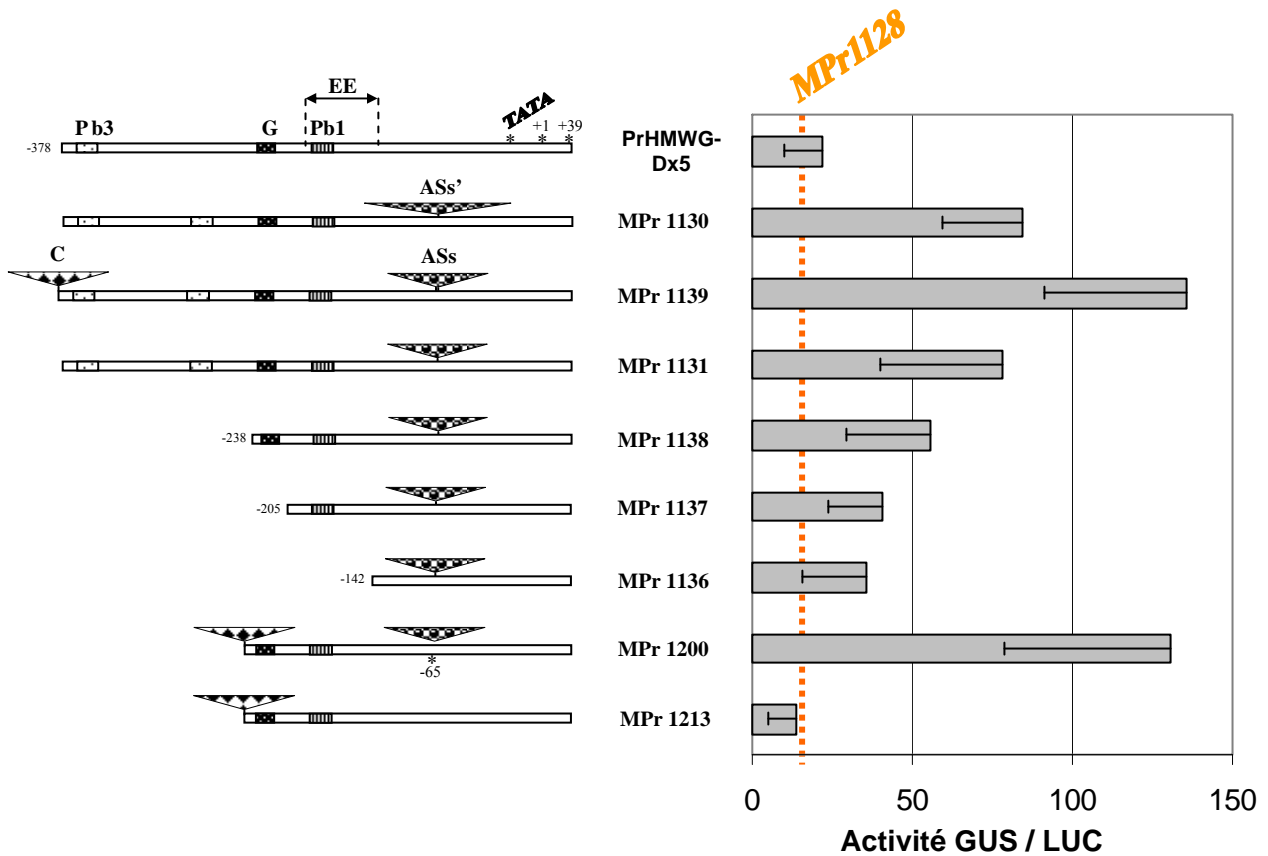


Figure 28 : Effet cis-activateur des séquences exogènes associées aux séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5 en expression transitoire dans l'albumen de maïs au stade de développement 12 DAP.

A gauche : représentation schématique des promoteurs chimériques dérivés de HMWG-Dx5 (MPr). Les éléments conservés du promoteur HMWG-Dx5 sont schématisés et la position des nucléotides qui bordent les différents promoteurs est indiquée. Les séquences activatrices as-2/as-1 (ASs, 38bp), as-2/as-2/as-1 (ASs', 55bp) du promoteur 35S du CaMV et les boîtes céréales (C, 66 bp) du promoteur HMWG-Bx7 fusionnées aux différentes séquences promotrices dérivées de HMWG-Dx5 sont représentées et leur position est indiquée.

A droite : activité transcriptionnelle des promoteurs correspondants dans l'albumen de maïs transformé transitoirement. Les valeurs représentent la moyenne d'au moins cinq expériences indépendantes et correspondent au rapport GUS/LUC. La barre d'erreur indique la déviation standard de la moyenne. L'activité moyenne dirigée par MPr1128 est montrée (trait pointillés orange).

Promoteur d'origine (*)	Séquence(s) <i>cis</i> exogène(s) associée(s)			Promoteur résultant (*)	Facteur d'activation
	as-1/as-2	as-2/as-2/as-1	Boîtes céréales		
PrHMWG-Dx5 (22)	+			MPr1131 (78)	3,5
MPr1128 (16)	+			MPr1138 (56)	3,5
MPr1127 (7)	+			MPr1137 (41)	5,8
MPr1126 (7)	+			MPr1136 (35)	5,0
PrHMWG-Dx5 (22)		+		MPr1130 (84)	3,8
MPr1128 (16)		+		MPr1135 (45)	2,8
PrHMWG-Dx5 (22)	+		+	MPr1139 (136)	6,2
MPr1128 (16)	+		+	MPr1200 (131)	8,2
MPr1131 (78)	O		+	MPr1139 (136)	1,7
MPr1138 (56)	O		+	MPr1200 (131)	2,3
MPr1128 (16)			+	MPr1213 (13)	0,8

Tableau 14 : Effet *cis*-activateur conféré par les éléments *cis* exogènes fusionnés aux séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5. Le facteur d'activation correspond au rapport « activité GUS moyenne (promoteur résultant) / activité GUS moyenne (promoteur d'origine correspondant) ». La déviation standard de la moyenne n'a pas été prise en considération. (*) Activité GUS moyenne mesurée en expression transitoire dans l'albumen de maïs transformé par biolistique avec la construction correspondante. (+), séquence(s) *cis* exogène(s) associée(s) ; (O), séquence *cis* exogène présente dans le promoteur d'origine.

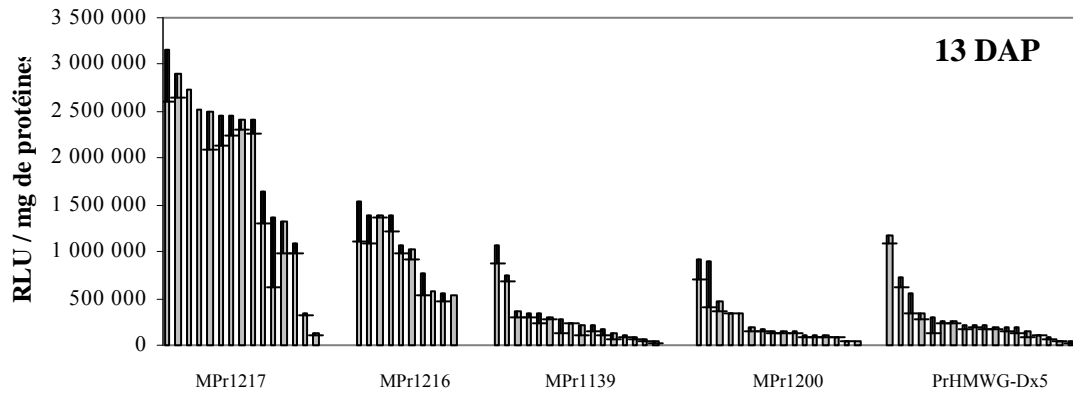
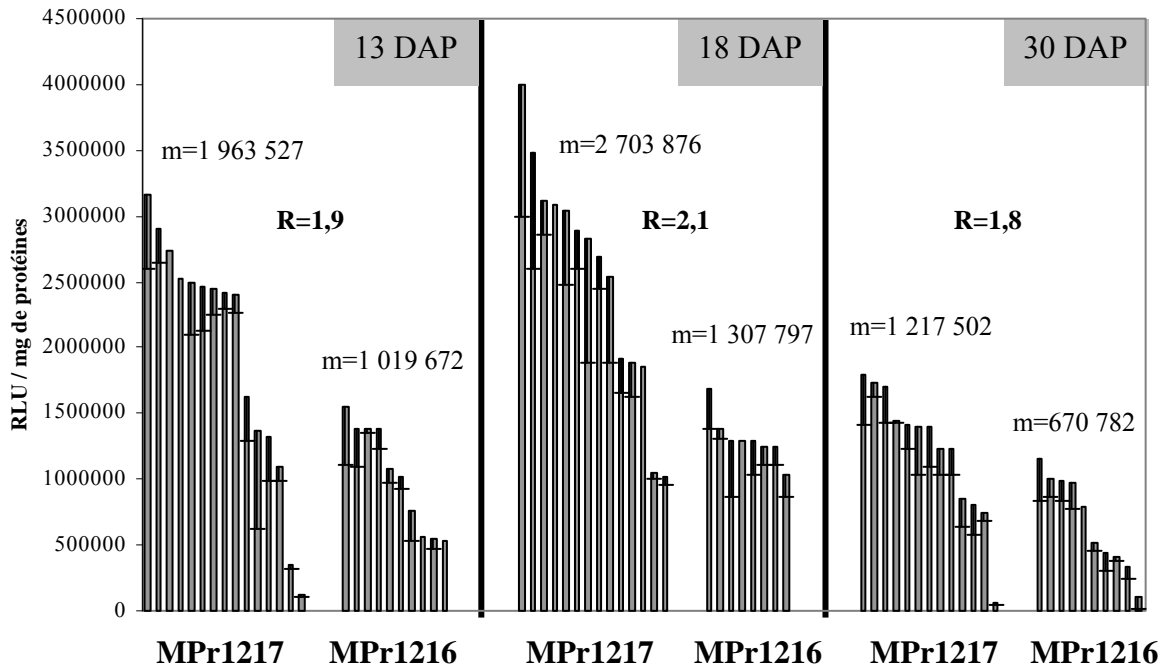
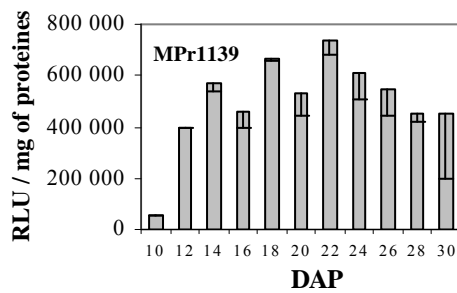


Figure 29 : Activité transcriptionnelle des promoteurs MPr1217, MPr1216, MPr1139, MPr1200 et PrHMWG-Dx5 au stade de développement 13DAP dans les grains de maïs transgéniques. Les histogrammes correspondent à l'activité GUS rapportée à la quantité de protéines solubles mesurés grain par grain. Les barres indiquent l'erreur standard par rapport à la moyenne.

(a)



(b)



(c)

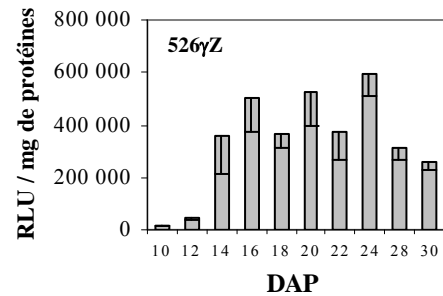


Figure 30 : Fluctuation temporelle de l'activité β -glucuronidase dans les grains de maïs transgéniques.

(a) Comparaison de l'activité de MPr1217 et de MPr1216 aux stades de développement 13, 18 et 30 DAP. m, activité β -glucuronidase moyenne obtenue dans chacune des populations de plantes aux différents stades de développement ; R, rapport d'activité GUS moyenne « MPr1217/MPr1216 » au stade de développement indiqué. (b) Activité temporelle de MPr1139. (c) Activité temporelle du promoteur de référence 526 γ Z. Les histogrammes correspondent à l'activité GUS rapportée à la quantité de protéines solubles mesurées grain par grain. Les barres indiquent l'erreur standard par rapport à la moyenne.

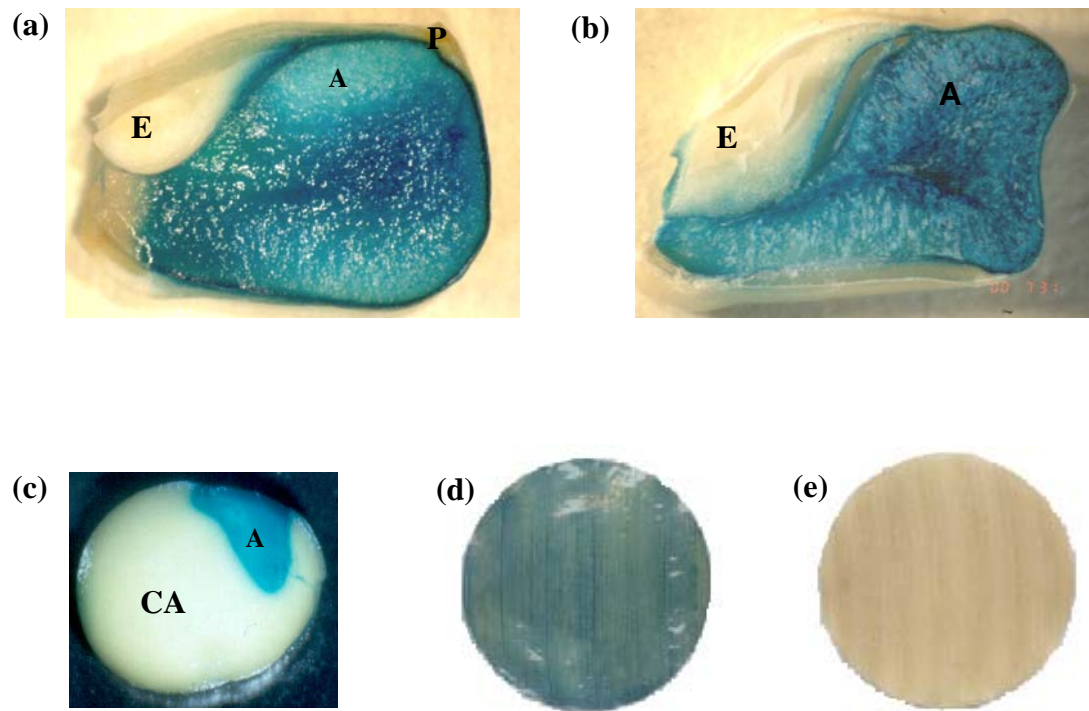


Figure 31 : Spécificité tissulaire du promoteur MPr1139. Visualisation histochimique de l'activité β -glucuronidase sous le contrôle de MPr1139 dans une coupe longitudinale d'un grain de maïs au stade de développement (a) 13 DAP et (b) 24 DAP. (c) Visualisation histochimique de l'activité β -glucuronidase sous le contrôle de MPr1139 à la périphérie d'un grain de maïs dont le péricarpe et partiellement la couche de cellules aleurones ont été enlevés. (d) Visualisation histochimique de l'activité β -glucuronidase sous le contrôle de MPr1139 dans les feuilles de maïs âgées de 3 semaines après acclimatation en serre. (e) Contrôle négatif de l'activité β -glucuronidase dans les feuilles de maïs L2. Albumen (A), cellules de l'aleurone (CA), embryon (E) et péricarpe (P).

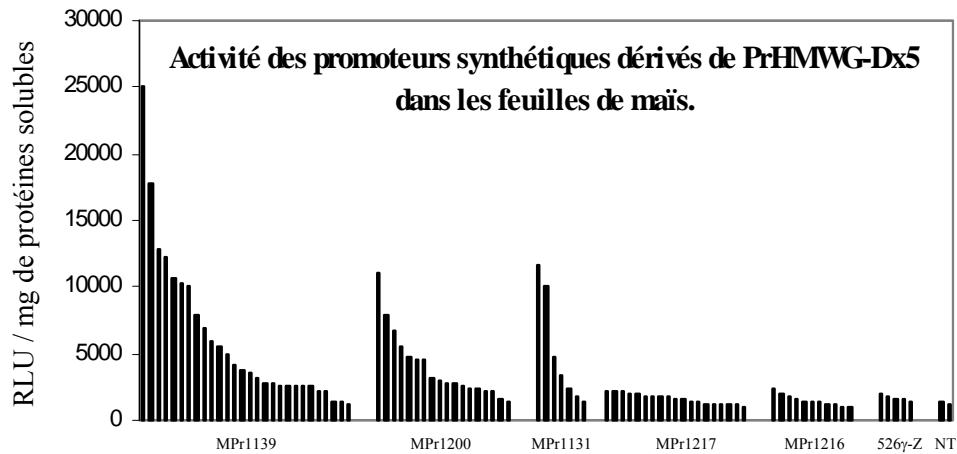


Figure 32 : Activité GUS dirigée par les promoteurs synthétiques dérivés de HMWG-Dx5 et le promoteur 526 γ -zéine dans les feuilles des transformants primaires de maïs, 3 semaines après acclimatation en serre. Les valeurs sont présentées sous la forme d'unités relatives de lumière émise (RLU) rapportées à la quantité de protéines solubles (mg). Chaque histogramme correspond à un transformant primaire de maïs. Pour chaque population de plantes, le promoteur utilisé pour exprimer la protéine GUS est indiqué. NT, non transformé.

Promoteurs	Tissus et organes de maïs				
	Albumen	Embryon	Cellules aleurones	Feuilles	Racines
PrHMWG-Dx5	+++	-	-	-	-
MPr1217	+++++	-	-	-	-
MPr1216	++++	-	-	-	-
MPr1139	++	-	-	+	+
MPr1200	++	-	-	+	+

Tableau 15 : Spécificité tissulaire des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les plants de maïs transgéniques. La force respective des différents promoteurs est illustrée sur une échelle de 1 à 8 par des croix (+) ; promoteur non exprimé (-).

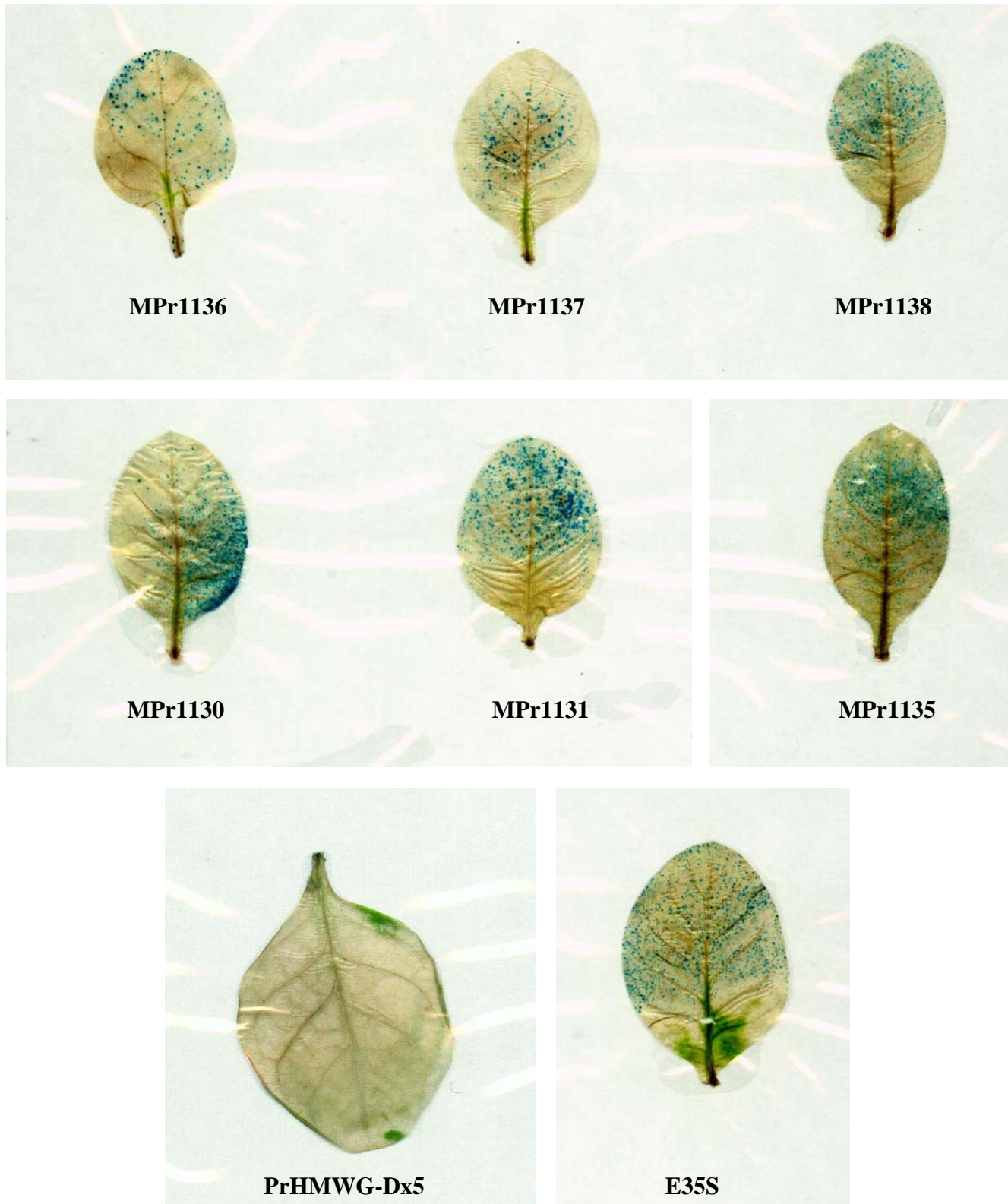


Figure 33 : Visualisation histochimique de l'activité β -glucuronidase dirigée par les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 (MPr), PrHMWG-Dx5 d'origine et le promoteur de référence forte E35S du CaMV en expression transitoire dans les feuilles de tabac PBD6, respectivement transformées par biolistique à l'aide des plasmides d'expression transitoire correspondants (MPr), le plasmide pMRT1125 (PrHMWG-Dx5) et le plasmide pMRT1092 (E35S).

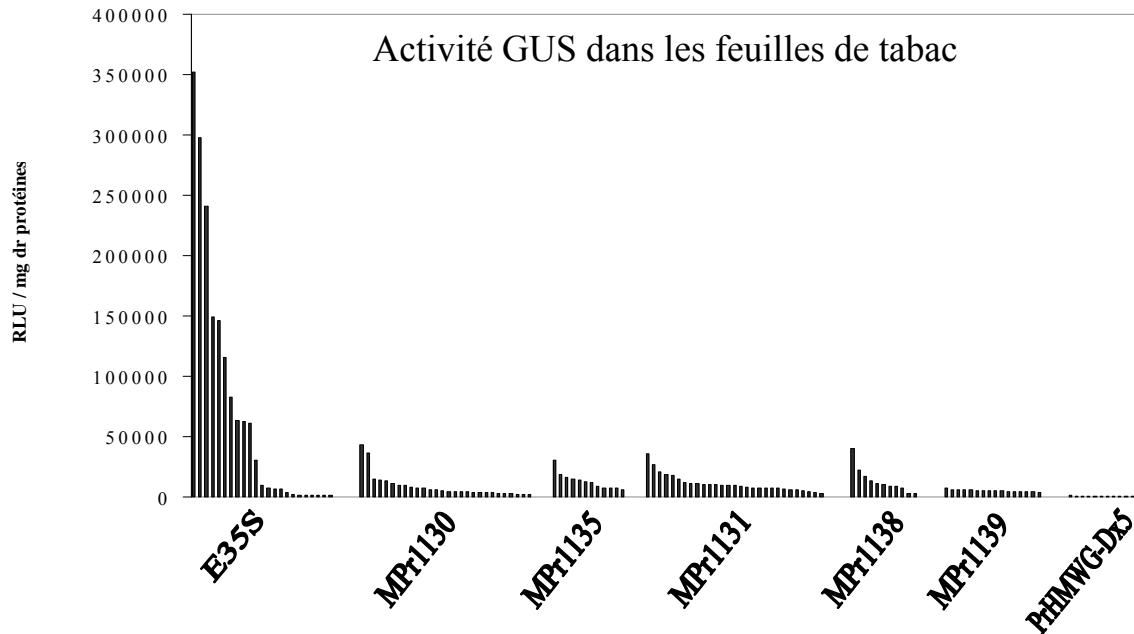


Figure 34 : Comparaison de l'activité GUS dirigée par les promoteurs synthétiques dérivés de HMWG-Dx5 avec celle du promoteur E35S du CaMV dans les feuilles des transformants primaires de tabac au stade de développement 11 semaines après acclimatation en serre. Les valeurs sont présentées sous la forme d'unités relatives de lumière émise (RLU) rapportées à la quantité de protéines solubles (mg). Chaque histogramme correspond à un transformant primaire de tabac. Pour chaque population de plantes le promoteur utilisé pour exprimer la protéine GUS est indiqué.

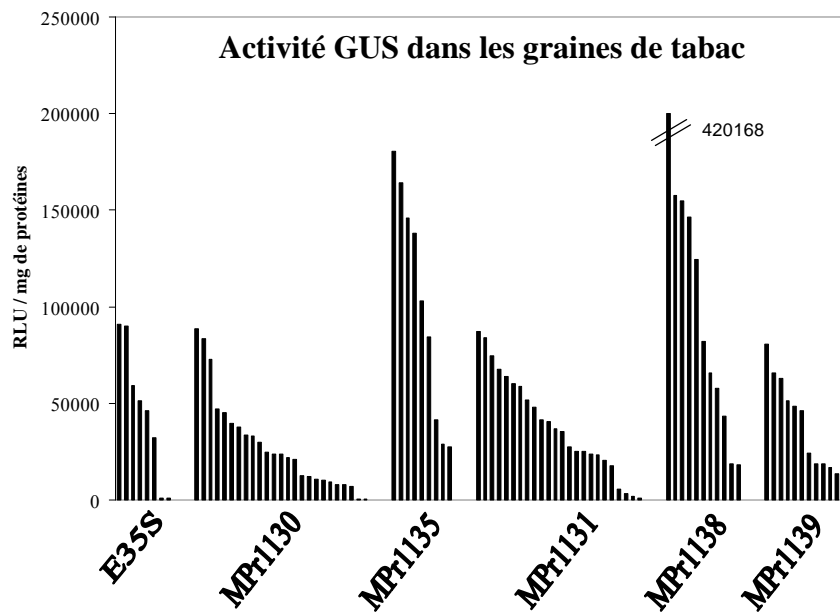


Figure 35 : Activité GUS dirigée par les promoteurs synthétiques dérivés de HMWG-Dx5 dans les graines matures des transformants primaires de tabac. Les valeurs sont présentées sous la forme d'unités relatives de lumière émise (RLU) rapportées à la quantité de protéines solubles (mg). Chaque histogramme correspond à un transformant primaire de tabac. Pour chaque population de plantes, le promoteur utilisé pour exprimer la protéine GUS est indiqué.

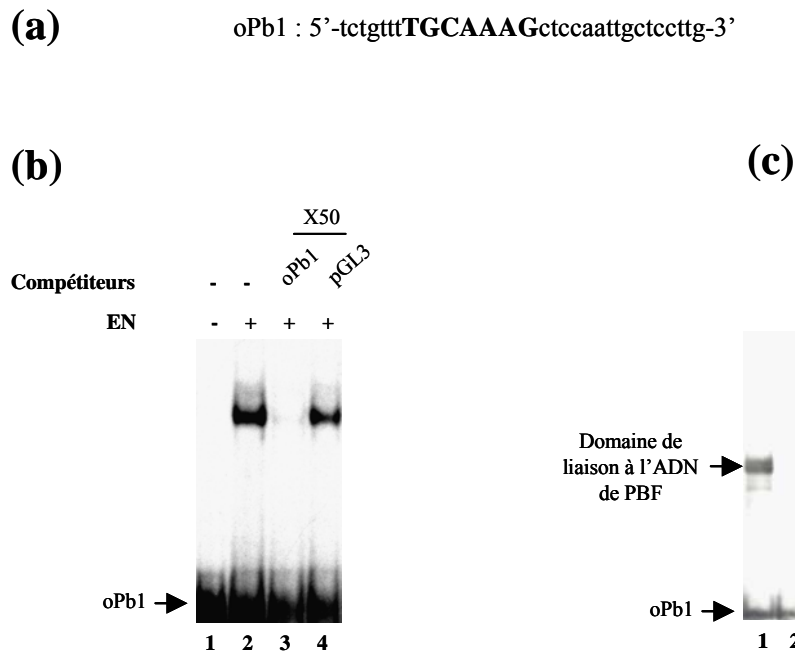


Figure 36 : Liaison *in vitro* du facteur de transcription PBF à la boîte prolamine Pb1 du promoteur HMWG-Dx5 de blé. (a) Séquence de l'oligodésoxynucléotide synthétique oPb1 utilisé dans les tests de retard de migration (EMSA). La boîte prolamine (Pb1) de PrHMWG-Dx5 est montrée (Lettres majuscules). (b) Complexe oPb1-protéine(s) spécifique. La sonde oPb1 a été incubée avec (pistes 2-4) et sans (piste 1) extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP. Les tests de compétition avec l'oligodésoxynucléotide oPb1 (piste 3) et un ADN non spécifique (pGL3 ; piste 4) sont montrés. (c) Liaison *in vitro* du domaine de liaison à l'ADN de la protéine PBF (aa 1-137) avec la boîte prolamine Pb1. La sonde oPb1 a été incubée avec le domaine de liaison à l'ADN de type sauvage (piste 1) et muté (aa 1-137 Δ Cystéine 62, piste 2) du facteur de transcription PBF.

- (a) oG : 5'-ggattacgccga**TTACGTGG**ctttagcagactg-3'
 oGm : 5'-ggattacgccga**TTCTCTGG**ctttagcagactg-3'
 oA1 : 5'-tctccac**TGACGT**aaggga**TGACG**Cacacg-3'
 oO2 : 5'-tggaagcttat**TCCACGTAG**Atgagatct-3'
 oAZM : 5'-tggaagcttatt**GACGTCA**aggagatct-3'

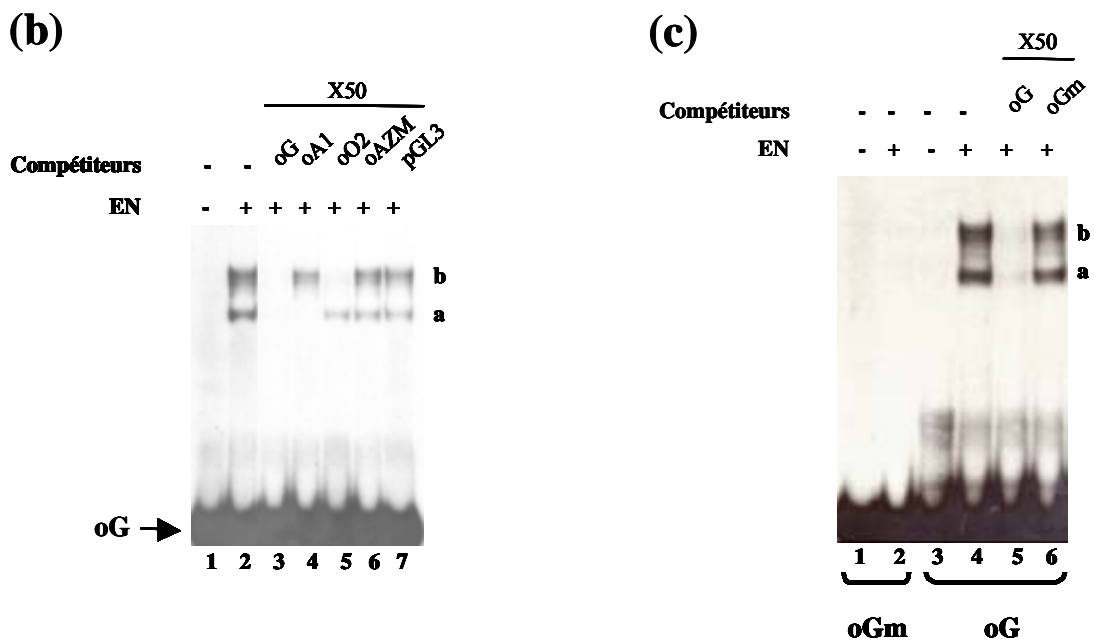


Figure 37 : Liaison *in vitro* des protéines nucléaires de l'albumen de maïs à la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5 de blé.

(a) Sequences des oligodésoxynucléotides synthétiques utilisés dans les tests de retard de migration (EMSA). La boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 de type sauvage (oG) et mutée (oGm), le motif Opaque 2 du promoteur α -zein de 22 kD (oO2), l'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV (oA1) et un motif core 5'-ACGT-3' (oAZM) sont représentés (Lettres majuscules).

(b) Complexes oG-protéines spécifiques. La sonde oG a été incubée avec (pistes 2-7) et sans (piste 1) extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP. Les tests de compétition avec les oligonucléotides oG (piste 3), oA1 (piste 4), oO2 (piste 5), oAZM (piste 6) et un ADN non spécifique (pGL3 ; piste 7) sont montrés.

(c) Les sondes oGm (lanes 1 et 2) et oG (lanes 3-6) ont été incubées avec (pistes 2 et 4-6) et sans (piste 1 et 3) extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP. Les tests de compétition avec les oligonucléotides oG (piste 5) et oGm (piste 6) sont montrés. Le complexe de migration rapide a été appelé « a » et le complexe de migration lente a été appelé « b ».

(a) **oA1** : 5'-tctccacTGACGTaagggaTGACGCacacg-3'
oG : 5'-ggattacgccgaTTACGTGGctttagcagactg-3'
oO2 : 5'-tggaagcttatTCCACGTAGA^atgagatct-3'
oAZM : 5'-tggaagcttattGCACGTCAaggagatct-3'

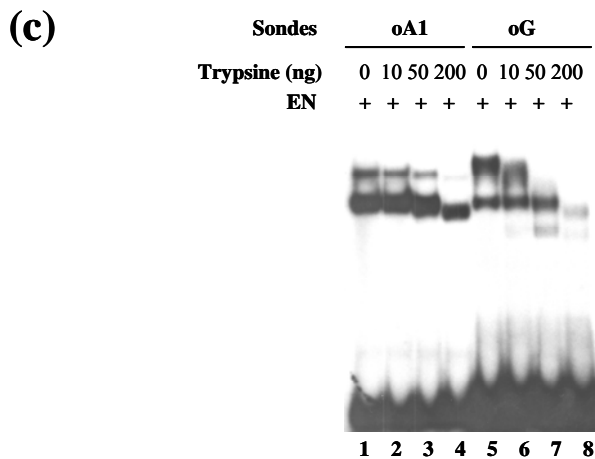
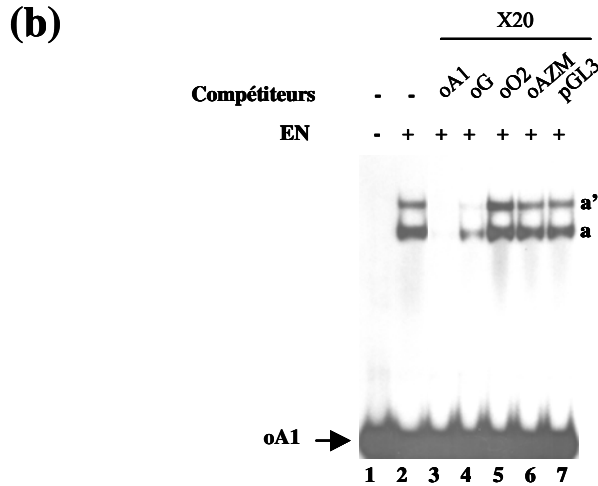


Figure 38 : Liaison *in vitro* des protéines nucléaires de l'albumen de maïs à l'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV. **(a)** Séquences des oligodésoxynucléotides synthétiques utilisés dans les tests de retard de migration (EMSA). L'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV (oA1), la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 (oG), le motif Opaque 2 du promoteur α -zein de 22 kD (oO2), et un motif core 5'-ACGT-3' (oAZM) sont représentés (Lettres majuscules). **(b)** Complexes oA1-protéines spécifiques. La sonde oA1 a été incubée avec (pistes 2-7) et sans (piste 1) extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP. Les tests de compétition avec les oligonucléotides oA1 (piste 3), oG (piste 4), oO2 (piste 5), oAZM (piste 6) et un ADN non spécifique (pGL3 ; piste 7) sont montrés. Le complexe de migration rapide a été appelé « a » et le complexe de migration lente a été appelé « a' ». **(c)** Digestion à la trypsine des complexes oA1-protéines et oG-protéines. Les complexes obtenus avec la sonde oA1 (piste 1) et oG (piste 5) ont respectivement été incubés avec 10 ng (Pistes 2 et 6), 50 ng (Pistes 3 et 7) et 200 ng (Pistes 4 et 8) de trypsine.

(a) **oO2** : 5'-tggaagcttat**TCCACGTAGA**tgagatct-3'
oG : 5'-ggattacgccga**TTACGTGG**ctttagcagactg-3'

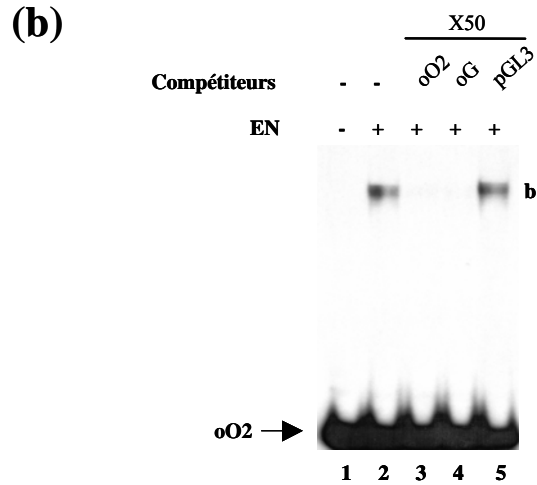


Figure 39 : Liaison *in vitro* des protéines nucléaires de l'albumen de maïs au motif Opaque-2 du promoteur α -zein de 22 kD. **(a)** Sequences des oligodésoxynucléotides synthétiques utilisés dans les tests de retard de migration (EMSA). Le motif Opaque-2 du promoteur α -zein de 22 kD (oO2) et la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 (oG) sont représentés (Lettres majuscules). **(b)** Complexe oO2-protéines spécifique. La sonde oO2 a été incubée avec (pistes 2-5) et sans (piste 1) extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP. Les tests de compétition avec les oligonucléotides oO2 (piste 3), oG (piste 4) et un ADN non spécifique (pGL3 ; piste 7) sont montrés. Le complexe retardé a été appelé « b ».

(a) oA1 : 5'-tctccacTGACGTaagggaTGACGCacacg-3'
 oG : 5'-ggattacgccgaTTACGTGGcttagcagactg-3'
 oAZM : 5'-tggaagcttattGCACGTCAaggagatct-3'

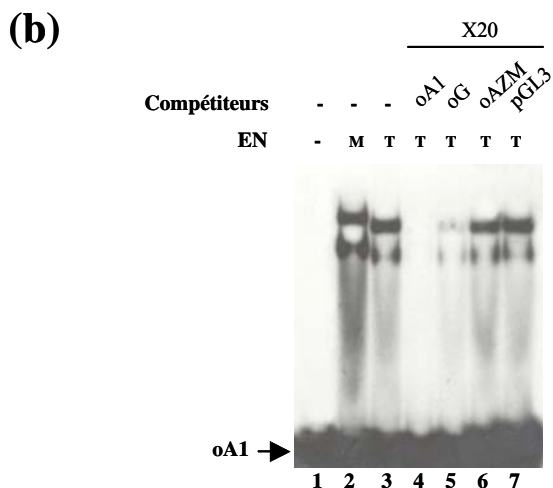


Figure 40 : Comparaison de l'activité de liaison à l'ADN de type ASF-1 de l'albumen de maïs (M) et des feuilles de tabac (T).

(a) Séquences des oligodésoxynucléotides synthétiques utilisés dans les tests de retard de migration (EMSA). L'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV (oA1), la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 (oG) et un motif core 5'-ACGT-3' (oAZM) sont représentés (Lettres majuscules).

(b) La sonde oA1 a été incubée seule (piste 1), avec des extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP (pistes 2) ou avec des extraits nucléaires de feuilles de tabac (piste 3-7). Les tests de compétition avec les oligonucléotides oA1 (piste 4), oG (piste 5), oAZM (piste 6) et un ADN non spécifique (pGL3 ; piste 7) sont montrés.

(a) oG : 5'-ggattacgccga**TTACGTGG**ctttagcagactg-3'
 oA1 : 5'-tctccac**TGACGT**aaggga**TGACG**Cacacg-3'
 oO2 : 5'-tggaa**gcttatTCCACGTAGA**tgagatct-3'

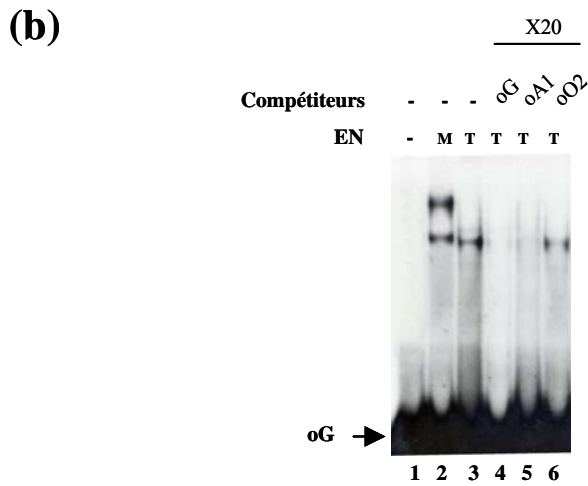
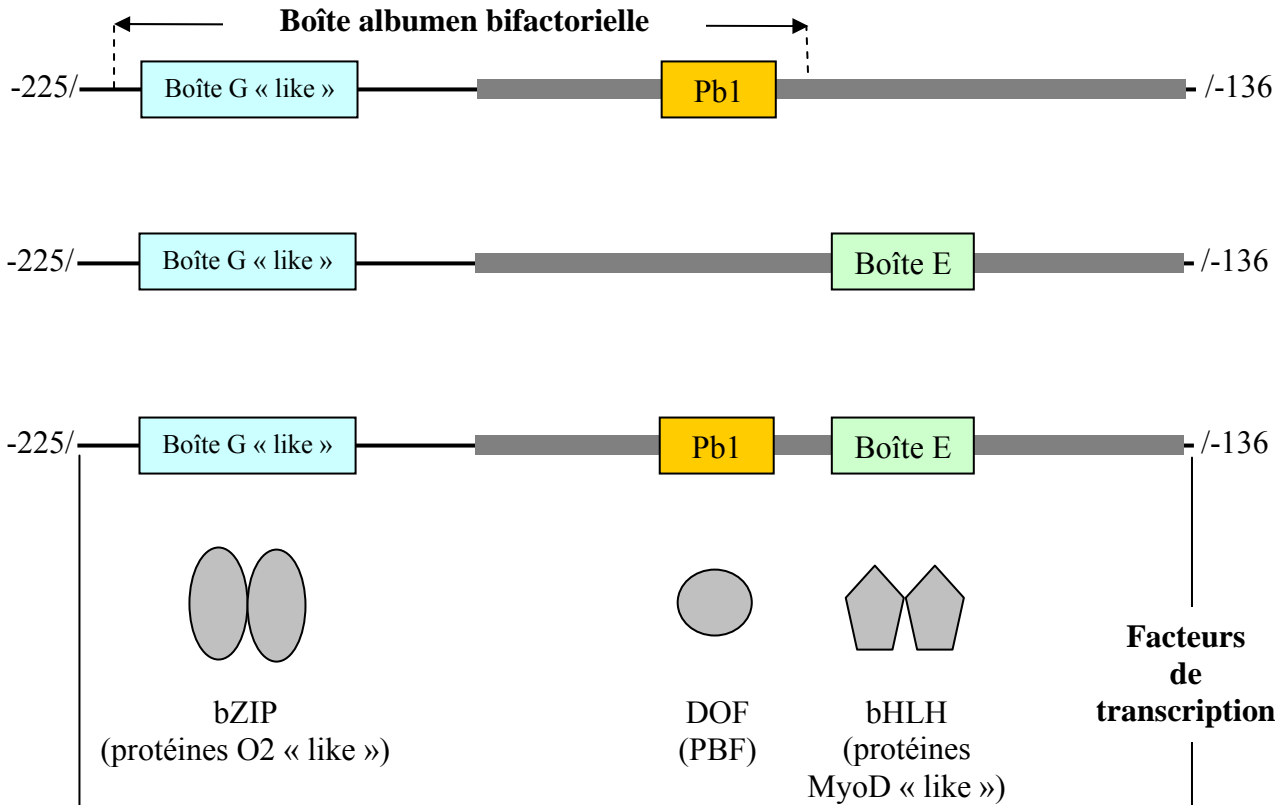


Figure 41 : Comparaison des complexes de liaison *in vitro* à la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 obtenus avec les extraits nucléaires de l'albumen de maïs (M) et les extraits nucléaires des feuilles de tabac (T). (a) Séquences des oligodésoxynucléotides synthétiques utilisés dans les tests de retard de migration (EMSA). La boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 (oG), l'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV (oA1), et le motif Opaque-2 du promoteur α -zein de 22 kD (oO2) sont représentés (Lettres majuscules). (b) La sonde oG a été incubée seule (piste 1), avec des extraits nucléaires d'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP (pistes 2) ou avec des extraits nucléaires de feuilles de tabac (piste 3-7). Les tests de compétition avec les oligonucléotides oG (piste 4), oA1 (piste 5) et oO2 (piste 6) sont montrés.

(A)



(B)

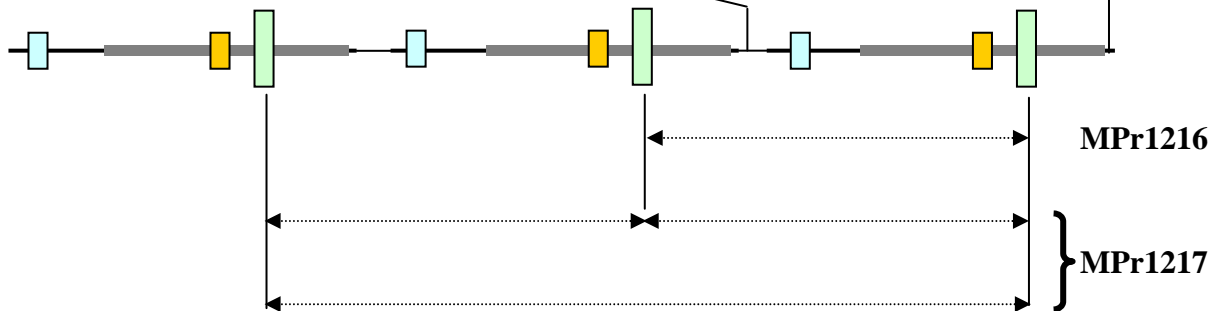


Figure 43 : Illustrations schématiques des unités *cis*-régulatrices potentiellement responsables de l'effet activateur conféré par la répétition du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 dans les promoteurs MPr1216 et MPr1217. (A) Le motif Pb1 (5'-TGCAAAG-3') et la boîte E (5'-CAATTG-3') peuvent respectivement agir seuls ou de manière coordonnée pour conférer en combinaison avec la boîte G « like » (5'-TTACGTGG-3') l'effet *cis*-activateur puissant attribuable au fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5. Les familles de facteurs de transcription susceptibles de lier la boîte G « like », le motif Pb1 et la boîte E sont indiquées. La boîte albumen bifactorielle atypique et l'élément activateur (Thomas et Flavell, 1990 ; trait gris épais) sont mentionnés. (B) Interactions synergiques hypothétiques (flèches bidirectionnelles) parmi les boîtes E de MPr1216 et MPr1217 qui résultent de la répétition en tandem direct du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5.

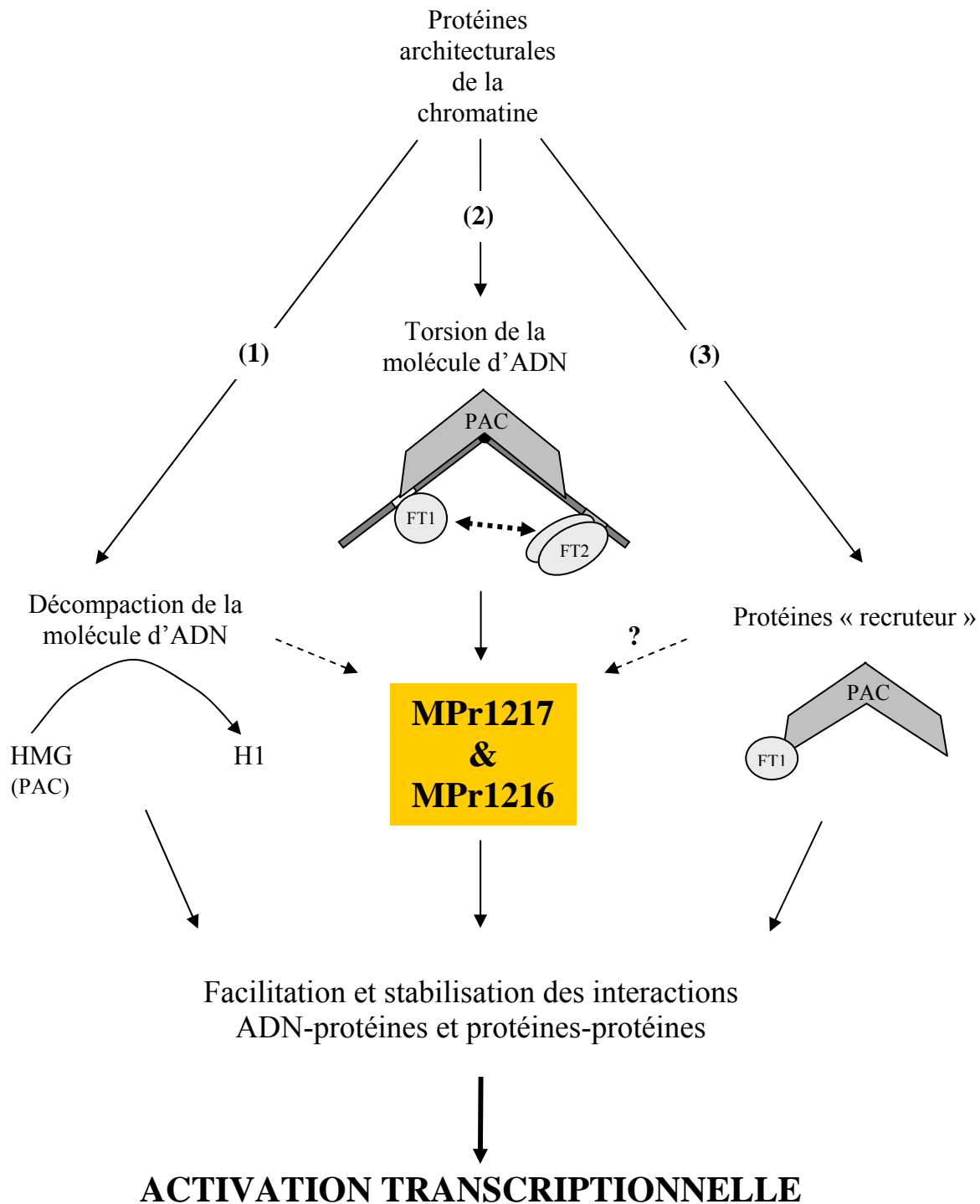


Figure 44 : Importance structurale de la chromatine sur l'activité transcriptionnelle des promoteurs MPr127 et MPr126. Fonctions régulatrices des protéines architecturales de la chromatine à travers le processus de décompaction de la molécule d'ADN (1), la stabilisation de la conformation tridimensionnelle de la molécule d'ADN (2) et en tant que protéines « recruteur » (3) pour faciliter et stabiliser les interactions ADN-protéines et protéines-protéines. Implications fonctionnelles indirectes potentielles (flèches traits pointillés). PAC, protéines architecturales de la chromatine ; FT, facteurs de transcription ; HMG, protéines « high mobility group » ; H1, histone H1

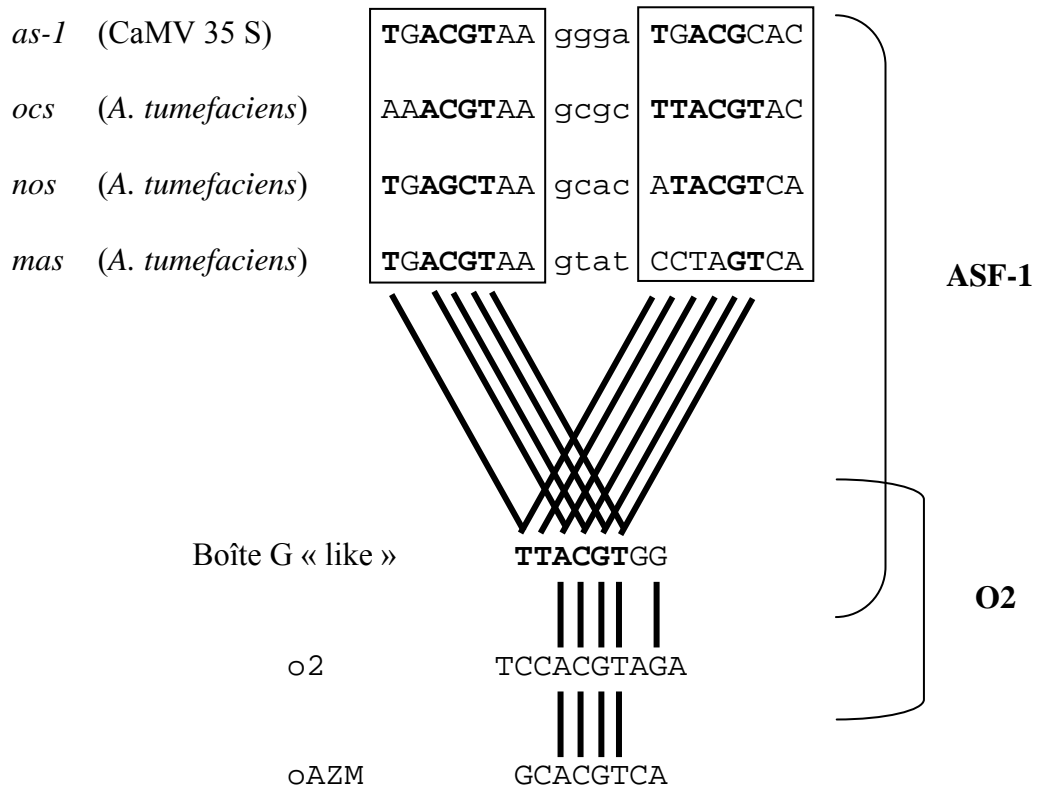
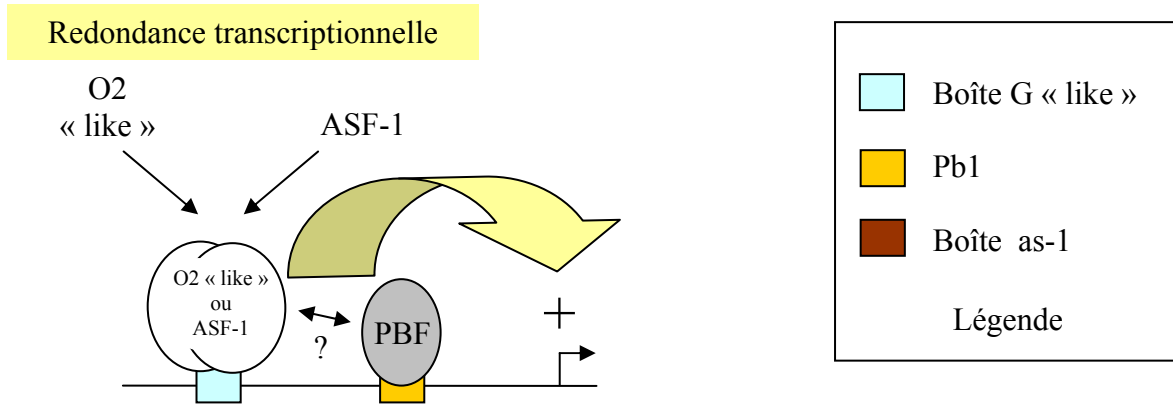


Figure 45 : Comparaison de la spécificité de liaison à l'ADN ASF-1 avec celle du facteur de transcription Opaque-2 (O2). L'alignement de la séquence de la boîte G « like » avec les séquences de type as-1 du promoteur 35S du CaMV (Lam et al., 1989) et des promoteurs *ocs*, *nos* (Bouchez *et al.*, 1989) et *mas* (Feltkamp *et al.*, 1994) de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* est montré. La séquence core des motifs caractéristiques des éléments de type as-1 est encadrée. o2, séquence cible du facteur de transcription O2 du promoteur du gène α -zéine de 22 kDa ; oAZM, motif core 5'-ACGT-3'.

αZ	CC ACGT AG
b-32	TG ACGT GA
O2	TG ACGT TG
γZ	TT ACGT AG
	■ ■
Boîte G "like"	TT ACGT GG

Figure 46 : Homologie de la séquence de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 avec le groupe de séquences cibles de la protéine O2 qui comporte une séquence core 5'-ACGT-3' dans le promoteur des gènes α -zéine de 22 kDa (αZ , Schmidt *et al.*, 1992), b-32 (Lomher *et al.*, 1991), opaque-2 (O2, Lomher *et al.*, 1991) et γ -zéine de 27 kDa (γZ , Ueda *et al.*, 1992).

(a)



(b)

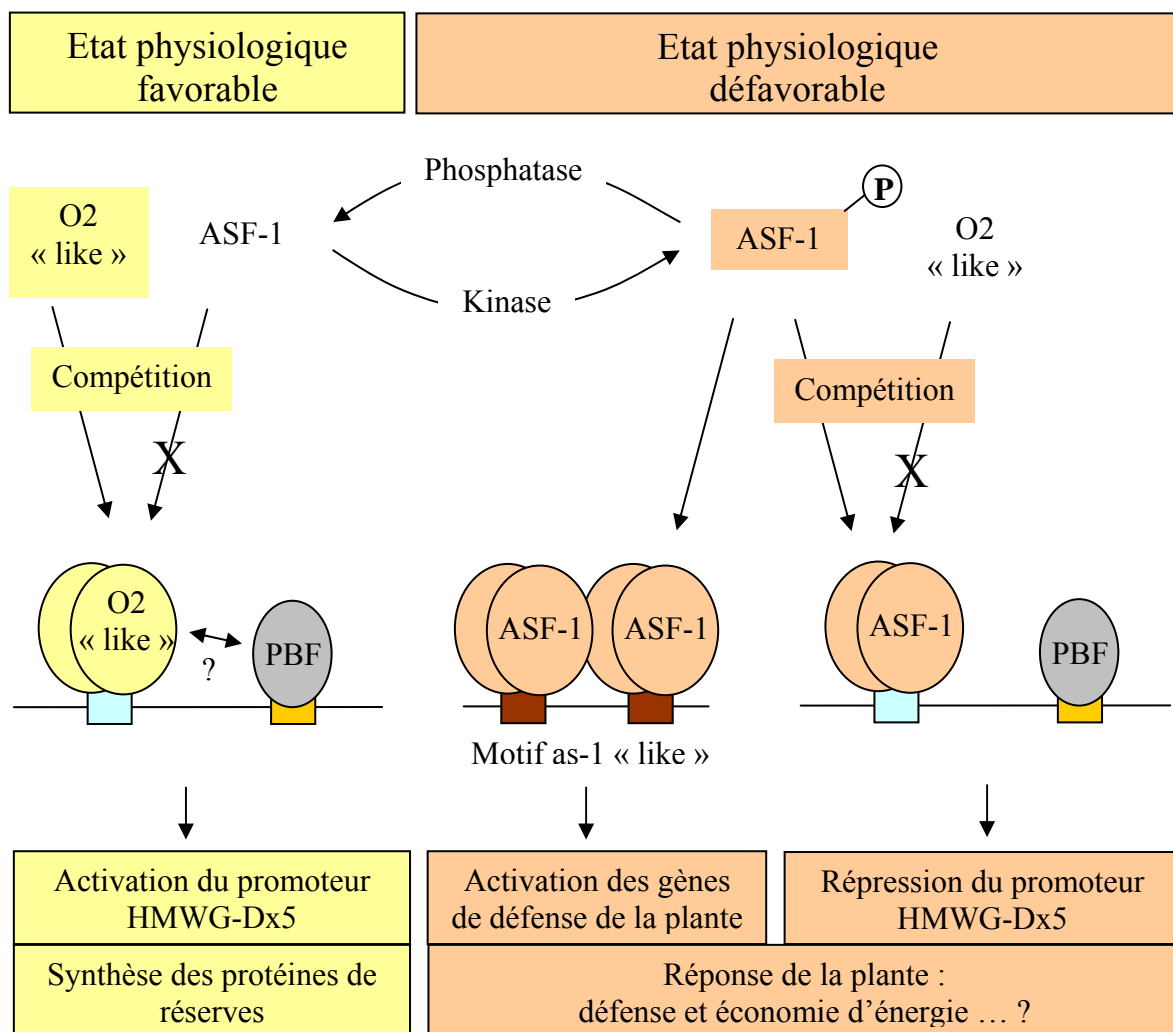


Figure 47 : Modèles de la régulation transcriptionnelle de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs. (A) Redondance transcriptionnelle des facteurs de transcription O2 « like » et ASF-1, lesquels peuvent alternativement activer PrHMWG-Dx5 à travers la boîte albumen bifactorielle *via* une interaction avec la protéine PBF. (B) Interaction compétitive des facteurs de transcription O2 « like » et ASF-1 avec la boîte G « like » dépendante de l'état physiologique de la plante. (+), activation transcriptionnelle ; P, phosphate.