



HAL
open science

Analyse fonctionnelle de la protéine WSCP chez *Arabidopsis thaliana*

Edouard Boex-Fontvieille

► **To cite this version:**

Edouard Boex-Fontvieille. Analyse fonctionnelle de la protéine WSCP chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00837559

HAL Id: tel-00837559

<https://theses.hal.science/tel-00837559>

Submitted on 22 Jun 2013

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.

UNIVERSITE DE GRENOBLE
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE
Discipline : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement par
Edouard Boex-Fontvieille
Le Vendredi 17 Septembre 2010

Analyse fonctionnelle de la protéine WSCP chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse co-dirigée par
Steffen Reinbothe et Christiane Reinbothe

Composition du jury

Mr Stefan Nonchev	<i>président</i>
Mr Pierre Carol	<i>rapporteur</i>
Mr Philippe Etienne	<i>rapporteur</i>
Mr Gilles Vachon	<i>examineur</i>
Mr Steffen Reinbothe	<i>examineur</i>
Mme Christiane Reinbothe	<i>examineur</i>

Thèse préparée au Laboratoire Plastes et Différenciation Cellulaire

Je suis le plus grand auteur maudit, j'ai jamais écrit une ligne.

Brève de comptoir rapportée par Jean-Marie Gourion

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Monsieur Stefan Nonchev, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Monsieur Pierre Carol et Monsieur Philippe Etienne d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également à Gilles Vachon d'avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tout particulièrement Christiane et Steffen Reinbothe pour leur encadrement et leur confiance tout au long de ma thèse.

Merci à Monsieur Michel Herzog de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi qu'à tous les membres du Laboratoire Plastiques et Différenciation Cellulaire.

Je remercie vivement Frank Buhr, Silva Lerbs-Mache, Régis Mache pour leur aide et leur disponibilité pendant l'agonie du laboratoire.

Merci aussi à Hanane, Laurence, Emilie, Guillaume, Jean-Marc, Gabrielle, Paul, Hélène, Eliane, Marcel, Daniel, Damien, Jean-Pierre, Alice, Gaëlle, Maryam, Abir, Jean-Jacques, Jacinthe, Stéphane et Claudia (Florian et Iga vous pouvez faire une croix dessus).

Une série de mercis tout particuliers à Denis Falconet, « Mr FtsZ » avec qui j'ai eu la chance de faire deux stages et qui m'a donné goût à la biologie végétale (et aux contrôles). Je tiens également remercier son thésard : mon petit Mohamed Karamoko avec qui j'ai passé d'inoubliables moments. Encore une fois merci à Gilles Vachon pour m'avoir donné ou prêté tant de matériels (microtome, vecteurs, souches, enzymes...) et donné tant de conseils ultra pertinents. Un grand merci à Fred Laporte et Michel Herzog pour m'avoir permis de continuer à utiliser le microscope et pour leur disponibilité.

Un énorme merci à Anne-Marie Labouré pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide technique et financière. Sans elle et ses crédits, j'aurais été dans l'incapacité de continuer la moindre expérience.

Je remercie infiniment toute ma famille de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans les projets que j'entreprends. Merci à mes anciens colloqs pour m'avoir fait connaître pendant un peu plus de deux ans la vie entre mâles avec tous les clichés/préjugés que nous avons tenus à appliquer à la lettre. On s'est bien marré.

Une éternelle reconnaissance pour Léa. Elle a su à de très nombreuses occasions me remonter le moral et me soutenir grâce à sa bonne humeur et sa joie de vivre. Elle a eu le courage de m'écouter rabâcher mon sujet de thèse avec la plus grande assiduité. Et surtout, merci d'avoir relu et corrigé, en première ligne, mes premiers jets lors de la rédaction du manuscrit.

Enfin, pour terminer, je voudrai remercier la Deutsche Forschungsgemeinschaft pour le financement de mes travaux de thèse.

3 AT : 3-amino-1,2,4-triazole
 AGP : Arabanigalactane
 aa : acide aminé
 ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
 ADN : Acide Désoxyribo-Nucléotide
 ADNc : ADN complémentaire
 APS : Ammonium Persulfate
 ARN : Acide RiboNucléotide
 ARNm : ARN messenger
 ATP : Adénosine TriPhosphate
 BET : Bromure d'éthidium
 BSA : Serum Albumine Bovine
 Chl : Chlorophylle
 Chlide : Chlorophyllide
 DEPC : diethylpyrocarbonate
 DMF : diméthylformamide
 DMSO : diméthylsulfoxyde
 dNTP : désoxyribonucléotide
 EBR : *epibrassinolide*
 ECL : *enhanced chemiluminescence*
 EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
 GA : Gibbérellines
 HRP : *Horseradish Peroxidase*
 IAA : *indole-3-acetic acid*
 IgG : Immunoglobuline
 kDa : kilo Dalton
 LB : *Luria Broth*
 MeJA : methyl jasmonate
 MES : Monohydrate N-(Morpholino)ethanesulfonic acid
 min : minute(s)
 MS : sels *Murachig-Skoog*
 NPA : *1-naphthylphthalamic acid*
 OligodT : Oligodésoxyribonucléotide
 PA : Phosphatase Alcaline
 pb : Paire de Bases
 Pchlde : Protochlorophyllide
 PCR : *Polymerase Chain Reaction*
 PMSF : phenylmethanesulphonylfluoride
 POR : *NADPH:protochlorophyllide oxydoreductase*
 ROS : *Reactive oxygen species*
 rpm : rotation par minute
 RT : Rétro-Transcription
 TAE : tampon Tris-Acétate-EDTA
 TBE : tampon Tris-Borate-EDTA
 TBS : *Tris-Buffered Saline*
 Tm : Temperature d'hybridation
 TNE : tampon Tris-NaCl-EDTA
 UV : Ultraviolet
 WSCP : *Water-soluble chlorophyll binding protein*
 X-Gluc : acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucoronique

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1 Classification des inhibiteurs de protéases.....	6
2 Les inhibiteurs Kunitz de protéase à sérine sont les plus répandus (et les plus étudiés) dans les familles botaniques.....	8
2. A Généralités.....	8
2. A.1 Découverte des inhibiteurs de type Kunitz.....	8
2. A.2 Vue d'ensemble.....	8
2. A.3 Propriétés d'inhibition.....	10
2. B Propriétés fonctionnelles.....	11
2. B.1 Protection contre les nuisibles.....	11
2. B.2 Fonctions hypothétiques dans la graine.....	13
2. B.3 Des protéines de type Kunitz sont exprimées dans le pistil au cours du développement floral.....	14
3 Les protéines WSCP, représentantes atypiques des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz.....	19
3. A La classe I.....	19
3. A.1 La photo-conversion de CP668 en CP740 de <i>Chenopodium album</i>	19
3. A.2 Organisation de CP668.....	20
3. A.3 Localisation de la WSCP de classe I.....	21
3. B La classe II.....	21
3. B.1 Séquence d'adressage.....	22
3. B.2 Le domaine Kunitz.....	22
3. B.3 Interaction entre WSCP de classe II et les pigments.....	24
3. B.4 Extrémité C-terminale.....	26
3. C Les fonctions hypothétiques des WSCP de classe II.....	27
3. C.1 Les plastes et les pigments végétaux.....	27
3. C.2 Synthèse et dégradation de la chlorophylle.....	28
3. C.3 Les WSCP seraient impliquées dans le stockage transitoire d'un précurseur de la chlorophylle chez l'orge (<i>Hordeum vulgare</i>) et dans la dégradation de la Chl.....	30
4 Présentation de la démarche expérimentale.....	31

MATERIELS ET METHODES

I Matériel biologique et conditions de culture.....	33
---	----

1. A Matériel végétal : matériel utilisé et conditions de culture.....	33
1. A.1 Ecotypes et lignées transgéniques.....	33
1. A.2 Conditions de culture	34
1. B Manipulation génétique des plantes.....	37
1. B.1 Croisement en retour ou <i>backcross</i>	37
1. B.2 Transformation stable d' <i>A. thaliana</i>	37
1. C Souches bactériennes et conditions de culture.....	38
1. C.1 Souches utilisées.....	38
1. C.2 Conditions de cultures solides et liquides	39
1. D Les levures	39
1. D.1 Souche utilisée	39
1. D.2 Milieux et conditions de culture.....	39
1. D.3 Transformation des levures	40
II Techniques de biologie moléculaire	40
2. A Transformation bactérienne et techniques de clonage.....	40
2. A.1 Préparation des <i>Escherichia coli</i> thermo-compétentes	40
2. A.2 Préparation des <i>Agrobacterium tumefaciens</i> thermo-compétentes	41
2. A.3 Transformation des bactéries par choc thermique	41
2. A.4 Techniques de clonages Gateway	42
2. A.5 Vecteurs utilisés et constructions réalisées	43
2. A.6 Extraction d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	44
2. A.7 Séquençage.....	45
2. B Méthode d'analyse des acides nucléiques.....	45
2. A.1 Extraction d'ADN d' <i>A. thaliana</i>	45
2. B.2 Southern blot	45
2. B.3 Réaction d'amplification en chaîne (PCR).....	46
2. B.4 Extraction des ARN totaux d' <i>A. thaliana</i>	46
2. B.5 Traitement des ARN à la DNase I.....	47
2. B.6 Analyse des ARN par retro-transcription et PCR semi-quantitative.....	48
2. B.7 Test double hybride	48
III Techniques de biochimie.....	49
3. A Surproduction de la protéine WSCP chez <i>E. coli</i>	49
3. B Purification des protéines sur colonne d'affinité Ni-NTA Agarose en condition dénaturante.....	49
3. C Obtention et caractérisation d'anticorps	50
3. D Essais d'inhibition de l'activité de la trypsine par WSCP	50

3. D.1 Par cinétique enzymatique	50
3. D.2 Par zymographie réverse	51
3. E Expérience de multimérisation de WSCP <i>in vitro</i>	51
3. F Extraction des protéines et méthodes associées	52
3. F.1 Extraction rapide pour électrophorèse	52
3. F.2 Extraction longue selon la méthode de Tanaka	53
3. F.3 Dosage des protéines par la méthode de « ESEN »	53
3. F.4 Séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse sur gel polyacrylamide en condition dénaturante et native	54
3. F.5 Coloration des protéines	54
3. F.6 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	55
3. F.7 Immunodétection des protéines	55
3. G Purification des thylacoïdes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
IV Techniques de biologie cellulaire.....	58
4. A Coloration GUS	58
4. B Coloration des tubes polliniques au bleu d'aniline	58
4. C Inclusions et coupes paraffines	58
4. D Coloration de coupes de tissus.....	59

CHAPITRE I: Identification d'un homologue des protéines WSCP chez *Arabidopsis thaliana*, étude de ses propriétés biochimiques et d'expression

1 Identification chez <i>Arabidopsis thaliana</i> d'un homologue des WSCP.....	61
1. A La protéine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> NP_177373.1 présente le plus d'identités de séquences avec les WSCP connues.	61
1. B La séquence identifiée appartient à la petite famille des protéines à domaine Kunitz chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
1. C Le modèle tridimensionnel du site de fixation de la chlorophylle du monomère WSCP d' <i>Arabidopsis</i> semble conservé.	63
2 Etude des propriétés biochimiques de la protéine WSCP	64
2. A Expression chez <i>E. coli</i> et purification de la protéine WSCP.....	64
2. B La protéine WSCP se multimérise en présence de thylacoïdes et de chlorophylle <i>in vitro</i>	66
2. C La protéine WSCP n'inhibe pas les protéases à sérine <i>in vitro</i>	67
2. C.1 La protéine WSCP n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de la trypsine..	67
2. C.2 La protéine WSCP n'inhibe pas les protéases à sérine par zymographie réverse	68
3 Expression de la protéine WSCP en condition normale de culture et en condition de stress	70

3. A Caractérisation d'un anticorps dirigé contre la protéine WSCP	70
3. B Expression de la protéine WSCP en conditions normales de croissance.....	71
3. B.1 La protéine WSCP est exprimée dans les inflorescences en conditions normales de croissance	71
3. B.3 La protéines WSCP est faiblement exprimée dans les plantules étiolées	72
3. C Etude de l'expression de WSCP en condition de déshydratation rapide et de stress salin.....	73

CHAPITRE II : Implication de WSCP dans le contrôle de la mort cellulaire au cours du développement floral

1 Description du mutant <i>wscp-Salk</i> (Salk_009681)	77
1. A Caractéristique de l'insertion de l'ADN-T chez le mutant <i>wscp-Salk</i>	77
1. B Le mutant <i>wscp-Salk</i> n'exprime pas la protéine WSCP	78
1. C Le mutant <i>wscp-Salk</i> se développe normalement en conditions standards de culture	79
1. D Présentation des lignées <i>wscp-Salk</i> surexprimant WSCP.....	80
2 WSCP est localisée dans le septum et dans le style des fleurs.....	81
2. A L'expression du promoteur <i>WSCP</i> est localisée dans le septum et le funicule des fleurs	81
2. B WSCP est présente dans le tissu de transmission du style.....	82
2. D WSCP est exprimée dans le tissu de transmission et dans les cellules de l'épiderme du septum.....	84
3 L'expression de la protéine WSCP est régulée par les facteurs de transcription NTT et HECATE	85
4 WSCP est impliquée dans la régulation de la mort cellulaire dans le tissu de transmission et dans l'épiderme du septum.....	87
4. A La matrice extracellulaire présente dans le tissu de transmission de <i>wscp-Salk</i> est similaire à celle du sauvage	88
4. B La mort cellulaire est étendue aux cellules de l'épiderme du septum chez le mutant <i>wscp-Salk</i>	89
4. C La mort des cellules du tissu de transmission est accélérée dans le septum des fleurs émasculées <i>wscp-Salk</i>	90
5 La mort précoce des cellules du tissu de transmission et celle anormale des cellules de l'épiderme du septum influence la croissance des tubes polliniques, la fécondation et la formation des graines.	92
5. A La croissance des tubes polliniques et leur sortie du septum sont faiblement altérées chez le mutant <i>wscp-Salk</i>	92
5. B Morphologie des tubes polliniques et distribution des graines lors d'une pollinisation minimale	93
5. C Les graines du mutant <i>wscp-Salk</i> présentent des différences mineures avec les graines du sauvage.....	96

6 WSCP interagit dans la levure avec les protéases à cystéine	98
CHAPITRE III : Expression de la protéine WSCP dans les plantules étiolées	
1 WSCP est exprimée dans les plantules étiolées	101
1. A WSCP est présente dans la crosse apicale des plantules étiolées	101
1. B Le mutant nul <i>wscp-Salk</i> et le surexpresser <i>35S::WSCP</i> n'ont pas de phénotype particulier lors de la skotomorphogénèse	102
2 Les facteurs de transcription NTT et HECATE régulent la transcription du gène <i>WSCP</i> à l'obscurité.....	104
2.A Les gènes <i>NTT</i> et <i>HEC</i> sont exprimés dans les plantules étiolées.....	104
2. B La transcription du gène <i>WSCP</i> est régulée différemment par les facteurs de transcription NTT et HECATE dans les plantules étiolées	105
2. C Le promoteur du gène <i>HEC1</i> est actif dans la crosse apicale et les cotylédons ...	106
3 Les hormones impliquées dans la formation de la crosse apicale régulent <i>WSCP</i>	107
3. A L'éthylène, les brassinostéroïdes et l'auxine influencent le niveau des transcrits <i>WSCP</i>	107
3. B La protéine <i>WSCP</i> est fortement exprimée dans la partie externe de la crosse apicale en présence d'éthylène	110
3. C NTT et HEC1 régulent le gène <i>WSCP</i> au niveau traductionnel ou post-traductionnel en présence de l'hormone éthylène	112
3. D Le mutant <i>wscp-Salk</i> ne présente pas de phénotype en présence d'éthylène	115
4 <i>WSCP</i> est régulée négativement à la lumière	115
4. A Analyse des transcrits et de la quantité de protéines <i>WSCP</i> au cours du dé-étiolement	116
4. B <i>WSCP</i> ne semble pas jouer un rôle lors du dé-étiolement.....	117
5 <i>WSCP</i> est une protéine de stress exprimée pendant la skotomorphogénèse ?.....	119
5. A Le promoteur du gène <i>WSCP</i> est actif lors de stress mécanique.....	119
5. B <i>WSCP</i> pourrait être impliquée dans le processus d'émergence des plantules hors du substrat.....	121
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	123
ANNEXES.....	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	148

INTRODUCTION

Chez les organismes supérieurs, environ 2 % des gènes codent pour des protéases encore appelées enzymes protéolytiques (Barrett *et al.* 2001). Ces enzymes sont largement répandues, on les retrouve chez de nombreuses plantes, animaux et microorganismes (Supuran *et al.* 2002 ; Mosolov et Valueva. 2005). Les protéases, sont des enzymes capables de cliver des liaisons peptidiques au sein de leurs protéines cibles. Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour ces protéases. Ces dernières sont regroupées en grandes familles selon le ou les acides aminés du site actif impliqué(s) dans la catalyse. On distingue ainsi les protéases à sérine, à cystéine et à aspartate. Il existe également une famille de protéases dont l'activité enzymatique dépend d'un ion métallique, ce sont les métalloprotéases.

Essentielles à la maintenance et à la survie des organismes hôtes, les protéases jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques. Elles sont notamment impliquées dans la progression du cycle cellulaire, dans la mort cellulaire ou encore dans la prolifération cellulaire (Turk. 2006). Bien que ces enzymes soient indispensables aux cellules et à l'ensemble des organismes qui les expriment, elles peuvent avoir un effet délétère. C'est le cas lorsque les concentrations en protéases deviennent trop importantes notamment suite à une augmentation de leur expression. Il est donc nécessaire que les activités de ces protéases soient finement régulées (Rawling *et al.* 2004). Dans un premier temps, la synthèse de ces enzymes sous la forme de précurseurs inactifs ainsi que leur spécificité de substrat permettent de moduler l'activité catalytique. Cependant, il existe des inhibiteurs protéiques capables, en se fixant au niveau du site actif des protéases, de réguler négativement leur activité catalytique. Ces inhibiteurs de protéases sont indispensables à la régulation de l'activité de leurs protéases partenaires. De ce fait, ils ont un rôle majeur dans de nombreux processus physiologiques et biologiques. C'est pourquoi, on les retrouve aussi bien dans les règnes animaux, végétaux que dans le règne bactérien (Supuran *et al.* 2002 ; Mosolov et Valueva. 2005).

1 Classification des inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases sont nombreux ce qui a rendu nécessaire leur classement en familles et en clans. Ce classement prend en considération les homologies de séquences d'une part, et d'autre part les similarités retrouvées dans les structures tertiaires et dans les résidus constituant le domaine catalytique. Les homologies de séquences des domaines d'inhibition ont permis de les regrouper 48 familles (Rawlings *et al.* 2004 a ; Base de données

de protéases et d'inhibiteurs de protéases : MEROPS). Les inhibiteurs de protéases sont dits simples s'ils contiennent un seul domaine d'inhibition et complexes s'ils contiennent plusieurs domaines d'inhibition. Parmi les inhibiteurs complexes, on dénombre onze familles pouvant contenir entre deux et quinze motifs d'inhibition. La plupart d'entre eux sont dits homotypiques, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent qu'un seul type de domaine inhibiteur. Les hétérotypiques, en revanche, peuvent avoir plusieurs domaines d'inhibitions de nature différente. Sur la base de leurs structures tertiaires, 31 des 48 familles ont été organisées en 20 clans (Richardson *et al.* 2001 ; Trexler *et al.* 2001 ; Trexler *et al.* 2002).

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéases sont caractérisées par les acides aminés responsables de leur activité catalytique (sérine, cystéine et aspartate). Les groupes d'inhibiteurs de protéases découverts chez les plantes ont jusqu'ici toujours été classés en fonction du type de protéases inhibé (Ryan. 1990 ; Mosolov et Valueva. 2005 ; Tab. A). Cependant, des travaux récents ont invalidé cette classification. En effet, les inhibiteurs de type Kunitz influencent principalement l'activité des protéases à sérine, mais peuvent également influencer les protéases à aspartate et à cystéine (Oliva et Sampaio 2009 ; Oliva *et al.* 2010). De même, la famille des serpins inhibe les protéases à sérine mais aussi les protéases à cystéine (Lampl *et al.* 2010).

Par la suite, nous nous intéresserons uniquement aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz.

<u>Inhibiteurs de protéases à sérine</u>	<u>Protéases inhibées</u>
Soybean Kunitz inhibitor	Protéases à sérine/Protéase à cystéine/ Protéase à aspartate
Baumann-Birk	Protéases à sérine
Potato I inhibitor	Protéases à sérine
Potato II inhibitor	Protéases à sérine
Pumpkin trypsin inhibitors/Squash inhibitors	Protéases à sérine
Trypsin and α -amylase inhibitors from cereal grains	Protéases à sérine
Mustard trypsin inhibitors	Protéases à sérine
Serpins	Protéases à sérine/Protéases à cystéine
<u>Inhibiteurs de protéases à cystéine</u>	
Phytocystatin	Protéases à cystéine

Tableau A : Classification et distribution des inhibiteurs de protéases chez les plantes (D'après Mosolov et Valueva. 2005).

2 Les inhibiteurs Kunitz de protéase à sérine sont les plus répandus (et les plus étudiés) dans les familles botaniques

2. A Généralités

2. A.1 Découverte des inhibiteurs de type Kunitz

En 1917, Osborne et Mendel, chercheurs au *Connecticut Agricultural Experiment Station*, ont démontré que l'alimentation à base de soja brut offrait une valeur nutritionnelle inférieure à celle du soja préalablement chauffé à la vapeur (Osborne et Mendel. 1917). Ces recherches ont favorisé le développement d'une industrie lucrative de préparation du soja pour l'élevage. Cette étape est nécessaire car l'alimentation des animaux monogastriques avec du soja brut cause des hypertrophies du pancréas. Cet organe, constamment sollicité, peut sur le long terme cesser de fonctionner.

Dans les années 1940, Moses Kunitz a purifié et caractérisé le facteur antinutritionnel majeur des graines de soja (*Glycine max* ; Kunitz. 1945 ; Kunitz. 1946 ; Kunitz. 1947). Il s'agit d'un inhibiteur protéique de la trypsine (protéase à sérine) qui porte maintenant le nom d'inhibiteur de type Kunitz. L'amélioration de la qualité nutritive est, en partie, due à la dégradation de cet inhibiteur pendant le processus de chauffage du soja à la vapeur. Toutefois, ce type de préparation n'est pas exempt de défauts. En effet, le conditionnement du soja a un coût et le processus de fabrication peut détériorer certains composés essentiels qui devront alors être ajoutés à l'alimentation des animaux pour accroître encore sa valeur nutritive (McGinnis et Evan. 1947). Pour tenter de remédier à cela, Moses Kunitz et collaborateurs ont étudié des centaines d'échantillons de graines de soja à la recherche de variations du niveau d'expression de ces inhibiteurs.

2. A.2 Vue d'ensemble

Les inhibiteurs de type Kunitz sont les plus répandus dans le règne végétal. A titre d'exemple, ces inhibiteurs sont retrouvés chez onze familles botaniques dont les *Leguminosae*, *Gramineae*, *Cruciferae*, *Solenaceae* (Mosolov et Valueva. 2005). Les inhibiteurs de type Kunitz sont largement présents dans les graines où ils peuvent représenter chez les *Leguminosae* jusqu'à 6% des protéines totales (Brandon et Friedman. 2002). Ils sont également exprimés dans de nombreux organes comme les racines, feuilles, tiges...

Généralement, les plantes possèdent plusieurs isoformes d'un inhibiteur de protéases. Ainsi, il existe au moins dix gènes codant pour des inhibiteurs de type Kunitz dans le génome du soja, dont l'expression est modulée dans les différentes parties de la plante en fonction du stade de développement (Jofuku et Goldberg. 1989).

La majorité des protéines appartenant à cette famille a un poids moléculaire d'environ 20 kDa et possède deux ponts disulfures nécessaires à la bonne conformation de la protéine (Valueva *et al.* 1999). Toutefois, les mimosacées dérogent à la règle générale. En effet, l'inhibiteur est composé de deux polypeptides provenant du clivage d'un précurseur. Les deux chaînes α et β , font respectivement 15 et 5 kDa et sont reliées entre elles par un pont disulfure (Kortt et Jermyn. 1981 ; Joubert. 1983 ; Negreiros *et al.* 1991). Les conséquences de ces modifications post-traductionnelles sur les propriétés d'inhibition restent, à ce jour, inconnues. Par ailleurs, la plupart de ces inhibiteurs a un site actif unique impliqué dans l'interaction avec la protéase. Chez le pois carré *Psophocarpus tetragonolobus*, l'inhibiteur WCBI est capable d'inhiber l'activité enzymatique de deux chymotrypsines en même temps grâce à ses deux sites actifs indépendants (Kortt. 1980 ; Dattagupta *et al.* 1999).

Les structures secondaires des inhibiteurs de type Kunitz sont dépourvues d'hélices α . Le repliement est composé de 12 feuillets β reliés entre eux par de longues boucles formant une structure en tonneau avec un de ces côtés recouvert d'un « couvercle » (Song et Suh. 1998). La structure du complexe protéase-inhibiteur a apporté de nombreuses informations sur la compréhension du mécanisme d'interaction (Blow *et al.* 1974). Le site impliqué dans l'inhibition contient généralement un di-peptide constitué d'une arginine et d'une sérine ou d'une arginine et d'une lysine, situé au sein d'une boucle formée par le premier pont disulfure. L'inhibiteur a une forte affinité pour le site actif de la protéase ce qui se traduit par une constante d'inhibition faible ($K_i=10^{-9}$ M à 10^{-14} M lors de la formation de complexes avec certaines protéases à sérine ; Blow *et al.* 1974). De plus, la dissociation du complexe protéase-inhibiteur n'est généralement pas associée à un clivage de l'inhibiteur par la protéase (Richardson. 1991 ; Birk. 2003). Ce mécanisme est différent de celui observé chez une autre classe d'inhibiteurs des protéases à sérine, les serpinines, parfois appelés « inhibiteurs suicides ». Le clivage d'une liaison peptidique dans le site actif de cet inhibiteur entraîne un changement rapide de sa conformation. Cette modification de structure provoque l'inactivation définitive de l'inhibiteur mais aussi du site catalytique de la protéase. Pour illustrer l'importance de ces inhibiteurs, il convient de mentionner le cas d'une serpinine d'orge

composant protéique majeur de la bière, résistant au processus de fermentation et probablement impliquée dans la consistance de la mousse (Huntington. 2006).

2. A.3 Propriétés d'inhibition

Les inhibiteurs de type Kunitz ont tout d'abord été décrits pour leur capacité à inhiber la trypsine et la chymotrypsine dans les années 40 (Kunitz. 1947). Des études ultérieures ont révélé les propriétés anti-protéasiques étonnantes de cette famille d'inhibiteur. En effet, ce sont les seuls inhibiteurs protéiques connus dans le règne végétal capables d'inhiber des protéases appartenant à trois classes différentes (Tab. B ; Mosolov et Valueva. 2005). Les inhibiteurs de type Kunitz ont également la propriété d'inhiber l' α -amylase chez l'orge (Vallee *et al.* 1998). Cette enzyme clive les liaisons $\alpha(1-4)$ glucosidiques des longs polymères de sucres en oligosaccharides. Ces inhibiteurs agissent sur les peptidases endogènes mais aussi sur celles d'une large variété d'organismes comme les insectes, champignons, animaux... Le très large panel de famille de protéases inhibées est présenté dans le tableau B (liste non-exhaustive).

Nom de l'inhibiteur de type Kunitz	Source	Enzymes cibles	Références
<i>Soybean Trypsin inhibitor</i>	<i>Glycine max</i>	Trypsin Chymotrypsin	Laskowski et Kato. 1980
<i>Barley Subtilisin Inhibitor</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Subtilisin α -amylase	Vallee <i>et al.</i> 1998
PCPI 8.3	<i>Solanum tuberosum</i>	Bromelain Papain Cathepsin L	Rowan <i>et al.</i> 1990
BcCI	<i>Bauhinia banhinioides</i>	Cruzain Cathepsin G Elastase	Oliva et Sampaio. 2009
BuXI	<i>Bauhinia unguolata</i>	Human plasmin Human factor XIIa Human factor Xa Human plasma kallikrein	Oliva <i>et al.</i> 2003
PDI	<i>Solanum tuberosum</i>	Cathepsin D	Mares <i>et al.</i> 1989

Tableau B : Enzymes inhibées par les protéines de type Kunitz.

Liste non-exhaustive des enzymes inhibées par cette famille protéique. Les protéases à sérine sont représentées sur fond bleu, les protéases à cystéine, sur fond jaune et la protéase à aspartate sur fond vert.

Cette famille d'inhibiteur influence également les propriétés catalytiques des protéases humaines comme les cathepsines, la kallikreine, l'élastase, les facteurs Xa et XIIa humains (tab. B). Ainsi de nombreuses études ont été menées afin de déterminer quelle est l'influence

de ces inhibiteurs sur la coagulation sanguine, la fibrinolyse (dissolution de caillots) ou encore pour connaître quels sont leurs effets anti-inflammatoires (Oliva *et al.* 2010). De manière intéressante, ces inhibiteurs semblent avoir des propriétés anti-tumorales. En effet, une protéine de type Kunitz, purifiée à partir de graines de soja, induit la mort de lignées cellulaires humaines d'origine leucémiques (Troncoso *et al.* 2007). Un autre inhibiteur, lui aussi purifié à partir de graines d'une variété de soja, supprime la prolifération ces cellules cancéreuses mammaires (Ye et Bun Ng. 2009). De plus, l'adhésion des cellules tumorales aux glycoprotéines de la matrice extracellulaire est régulée par un peptide dérivé d'un inhibiteur de la plante *Bauhinia rufa* (Nakahata *et al.* 2006).

2. B Propriétés fonctionnelles

2. B.1 Protection contre les nuisibles

Les plantes ne peuvent pas se déplacer pour échapper aux défis de leur environnement. Elles subissent des stress abiotiques, et les nuisibles comme les insectes, les nématodes, ou encore les champignons les agressent quotidiennement. C'est pourquoi, les plantes ont développé des mécanismes sophistiqués contre ces attaques. Elles perçoivent un signal d'agression qu'elles transforment en une réponse adaptative. La transduction du signal est rendue possible grâce à l'intervention de l'acide jasmonique, une hormone qui joue un rôle majeur dans le déclenchement des réactions de défense. Cette hormone et ses dérivés, les jasmonates, sont issus du métabolisme des acides gras (Wasternack. 2007). Les nuisibles infligent des blessures qui activent la biosynthèse d'un certain nombre de molécules de signalisation des jasmonates qui vont à leur tour induire l'expression de gènes de défense (Ryan. 2000).

Les gènes codants pour les inhibiteurs de protéases sont des composants majeurs de la lutte contre les nuisibles. Les inhibiteurs de type Kunitz sont induits lors de stress infligés par les nématodes (Brenner *et al.* 1998), les oomycètes (Valueva *et al.* 1998), ou encore les éliciteurs bactériens et fongiques (Li *et al.* 2008). Par ailleurs, les inhibiteurs de protéases de plantes sont capables de supprimer l'activité d'enzymes contenues dans le tube digestif des insectes comme cela a été montré dans de nombreuses d'études. A titre d'exemple, des travaux récents chez le peuplier ont montré qu'un inhibiteur de type Kunitz est capable de supprimer *in vitro* l'activité des enzymes digestives de la Livrée des forêts (Lépidoptère ;

Major et Constabel. 2008). L'apport d'inhibiteur de protéases à l'alimentation de certains insectes peut inhiber leur croissance, leur développement et leur reproduction.

De même, ces inhibiteurs seraient impliqués dans la protection de l'intégrité de la graine sèche. L'activité métabolique des graines sèches est quasi-nulle voire nulle. Dans ces conditions, les graines sont dans l'incapacité d'induire une réponse face à des insectes cléthrophages (insectes qui se nourrissent de graines sèches). Cependant, des inhibiteurs de protéases de type Kunitz et Bowman-Birk ou encore des lectines, inhibiteurs des α -amylases, sont présents dans ces graines sèches. Cette batterie d'inhibiteurs pourrait former un rempart contre les insectes en inhibant leurs enzymes gastriques (Chrispeels et Raikhel. 1991 ; Horisberger et Volanthen. 1983).

D'après des estimations, les ravageurs et les maladies sont responsables de 37 % des pertes agricoles dans le monde. Ce sont principalement des insectes phytophages, des mites, des nématodes et les maladies qu'ils engendrent (environ 200 en tout) qui causent ces pertes. De nombreuses techniques existent pour limiter les dégâts occasionnés, comme les pesticides, les rotations des cultures ou encore l'utilisation de prédateurs naturels. Ces dernières années, une approche biotechnologique a été développée. Elle est basée sur l'expression d'un gène conférant des résistances chez les plantes à intérêt agronomique. Un des exemples les plus connus est le maïs Bt qui exprime une toxine de *Bacillus thuringiensis*. Cette protéine est toxique pour le principal insecte nuisible du maïs, la pyrale. Cependant, il y a des limitations à l'utilisation de ces plantes transgéniques. En effet, la protéine est exprimée de manière constitutive ce qui favorise la sélection d'insectes résistants. Par ailleurs, le spectre des insectes prédateurs sensibles à la toxine est restreint (Haq *et al.* 2004). Une autre approche a consisté à exprimer cette fois-ci des inhibiteurs de protéases, composants majeurs dans la protection contre les agressions de l'environnement. La première expérience de ce type a eu lieu en 1987. Hilder et collaborateurs ont exprimé un gène codant pour un inhibiteur de protéase à sérine (de type Bowman-Birk) chez le tabac. Chez ces plantes, les dégâts occasionnés par le lépidoptère *Heliothis virescens* sont diminués de 50 % par rapport aux plantes sauvages. Ceci doit venir du fait que les enzymes gastriques de ces insectes sont majoritairement des protéases à sérine (Hilder *et al.* 1987 ; Haq *et al.* 2004).

Les gènes codant pour des inhibiteurs de protéases de type Kunitz ont été exprimés chez le tabac, le riz, la patate et la patate douce. Ces plantes transgéniques présentent des

résistances contre les lépidoptères (*Spodoptera litura* ; *Spodotera littoralis*) ou les Hémiptères (*Nilaparvata lugens*) ou encore les coléoptères (*Weevilcyclas puncticollis*).

2. B.2 Fonctions hypothétiques dans la graine

2. B.2.a Inhibiteur de protéases, Protéines de réserve

Au cours de la formation des graines, il y a une accumulation de réserves dont des carbohydrates, des triglycérides (lipides neutres) et des protéines. Ces réserves sont stockées durant le milieu et la fin du développement de la graine. Les protéines de réserve s'accumulent dans des compartiments cellulaires reliés aux membranes, ce sont les corps protéiques. En fonction des familles de plantes, les protéines de réserve sont principalement retrouvées dans l'albumen et/ou dans les cotylédons des jeunes plantes. Les premières études menées autour des protéines de réserve remontent au XVIIIème siècle. En 1924, Osborne propose une première classification basée sur leurs solubilités respectives dans l'eau (albumines), dans différentes solutions salines (globulines), dans des mélanges hydro-alcooliques (prolamines) et dans des solutions acides ou alcalines (glutélines). Actuellement, prolamines et glutélines sont réunies sous le terme de prolamines, et certains auteurs simplifient également cette liste en deux super-familles : celle des prolamines (albumines, prolamines, glutélines) et celle des globulines (Shewry *et al.* 1995).

En plus des protéines de réserve « classiques », on retrouve également les inhibiteurs de protéases qui sont très largement présents notamment dans les graines des légumineuses. Certains de ces inhibiteurs sont largement représentés dans la graine et leur diminution rapide pendant la germination est concomitante avec celle des protéines de réserve (Mosolov et Valueva. 2005). On peut donc envisager que les inhibiteurs de protéases soient des protéines de stockage comme les prolamines et les globulines. De plus, il a été montré que certains inhibiteurs appartiennent à des familles de protéines de réserve, suggérant une origine commune. La première homologie fut établie pour un inhibiteur de trypsine d'orge et l'albumine 2S de ricin (*Ricinus communis* ; Odani *et al.* 1983). Par ailleurs, des inhibiteurs de protéases de l' α -amylase d'orge et de blé appartiennent à la même famille que les prolamines du genre *Triticeae* (Kreis *et al.* 1985).

2. B.2.b Les inhibiteurs de type Kunitz seraient impliqués dans le contrôle de la protéolyse lors la formation de la graine et de la germination

Les inhibiteurs de protéases pourraient également jouer un rôle dans le contrôle de la dégradation des protéines de réserve par les protéases endogènes. En effet, la synthèse d'un inhibiteur de protéases à cystéine, la cystatine, débute avant l'accumulation des protéines de stockage (Kondo *et al.* 1990 ; Kuroda *et al.* 2001). Les cystatines et d'autres inhibiteurs pourraient donc intervenir dans la prévention des dégradations prématurées des protéines de stockage au cours de la maturation des graines (Arai *et al.* 2002). De plus, les inhibiteurs de protéases régulent l'activité protéolytique au cours de la germination. C'est le cas d'un inhibiteur de la trypsine qui supprime l'activité des protéases à sérine durant les premières heures de la germination (Shain et Mayer. 1965).

2. B.3 Des protéines de type Kunitz sont exprimées dans le pistil au cours du développement floral

2. B.3.a Organisation de la fleur d'*Arabidopsis thaliana*

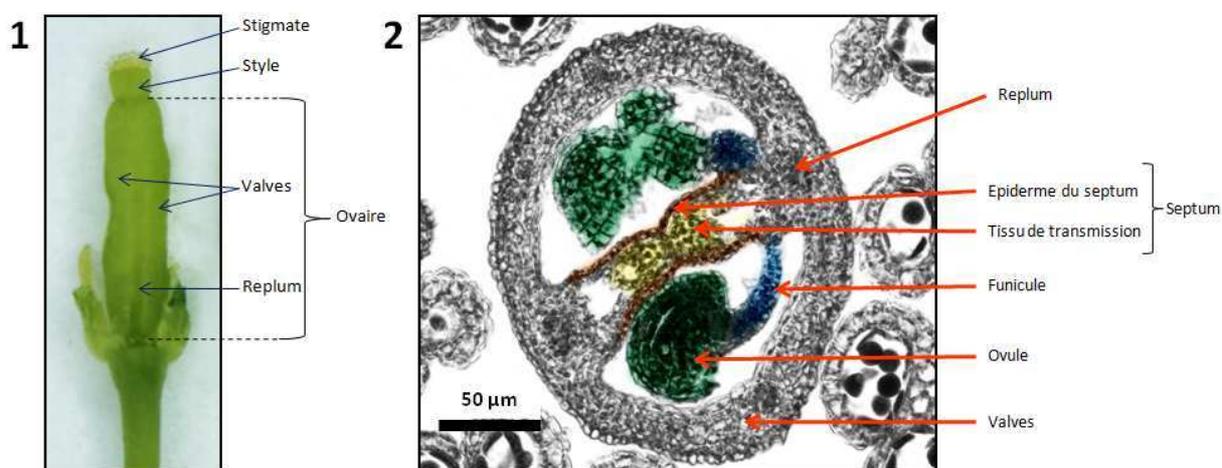


Figure A : Structure du pistil d'*A. thaliana* au cours du développement floral.

1) Pistil d'une fleur d'*A. thaliana* avant l'anthèse (stade 12 ; stades décrits par Smith *et al.* 1990). Les pétales, les sépales et les étamines ont été retirés.

2) Coupe transversale d'un pistil avant l'anthèse. La fleur (stade 12) est fixée, incluse dans la paraffine et des sections de 10 μm sont réalisées. Les coupes sont colorées au *Fast Green FCF*. Les différentes parties du pistil sont ensuite colorées artificiellement par ordinateur.

Le pistil ou gynoecium est composé de trois parties bien distinctes chez *Arabidopsis thaliana* : le stigmate, le style et l'ovaire (Fig. A 1). Le stigmate est composé d'environ 150 cellules épidermales allongées ou papilles stigmatiques (Sessions et Zambryski. 1995). Ce tissu est impliqué dans l'adhérence et l'hydratation des grains de pollen afin de permettre leur germination. Le style fait la connexion entre le stigmate et l'ovaire. Cette partie du pistil peut varier considérablement en longueur en fonction des espèces de plantes. Chez le lilas

(*Syringia vulgaris*) par exemple, le style est long et forme une structure ouverte alors que chez *Arabidopsis*, il est plutôt de petite taille et fermé. Dans la figure A 1, on ne distingue des ovaires que les valves fusionnées au niveau du replum. Le replum est une sorte de reliquat de la fusion congénitale des deux carpelles qui ont formé le pistil.

La figure 1 B représente une coupe transversale d'un ovaire avant l'anthèse, c'est-à-dire avant la pollinisation. Le septum divise l'ovaire en deux chambres ovariennes, ou locules, dans lesquelles se trouvent les ovules reliées au replum par le funicule. Le septum est composé d'un épiderme et du tissu de transmission. Ce tissu débute dans le style et continue jusqu'à la base de l'ovaire.

2. B.3.b Structure des tissus de reproduction et fonctions dans la croissance des tubes polliniques dans le gynoeceum d'*Arabidopsis*.

Comme nous venons de le mentionner, le pistil d'*Arabidopsis* est composé de deux carpelles fusionnés congénitalement. Au moment de la fécondation, les grains de pollen sont hydratés par les cellules du stigmate puis germent et s'allongent pour former le tube pollinique qui transporte les noyaux reproducteurs vers le sac embryonnaire. Du stigmate au sac embryonnaire, les tubes polliniques croissent dans le tissu de transmission puis sur l'épiderme du septum, le funicule et enfin traversent le micropyle (Smyth *et al.* 1990 ; Ferrándiz *et al.* 1999). A l'aide d'expériences de pollinisation minimales, Crawford et collaborateurs ont montré un pic de fertilisation et une répartition des graines se produisant à proximité du centre de la chambre ovarienne (Crawford *et al.* 2007). Le mouvement directionnel du tube pollinique vers les micropyles est lié au mécanisme de croissance de son extrémité qui nécessite un gradient intracellulaire de calcium (Li *et al.* 1999) qui pourrait être contrôlé par les cellules du tissu de transmission (Crawford et Yanofsky. 2008). A un moment donné, les tubes polliniques doivent réorienter leur croissance afin de sortir latéralement du tissu de transmission et trouver leur chemin jusqu'aux ovules. Un signal doit exister afin de diriger les tubes polliniques vers le micropyle des ovules. En effet, de nombreuses études vont dans ce sens. Certaines réalisées sur des mutants d'*Arabidopsis* ont montré une implication du sac embryonnaire haploïde et de l'ovule diploïde dans l'orientation des tubes polliniques vers le micropyle (Palanivelu et Preuss. 2000). D'autres ont permis de mettre en évidence le rôle potentiel de l'acide gamma-butyrique (GABA) dans la croissance des tubes polliniques (Palanivelu *et al.* 2003). Récemment, il a été démontré que la cellule centrale de l'ovule a une fonction dans l'orientation des tubes polliniques vers le micropyle (Chen *et al.* 2007).

Les tubes polliniques doivent donc traverser de nombreuses couches cellulaires dont le tissu de transmission avant de féconder un sac embryonnaire. Leur croissance est facilitée d'une part grâce à la production de matrice extracellulaire par les cellules du tissu de transmission et d'autre part, grâce à la mort cellulaire programmée (MCP) de ces mêmes cellules (Cheung *et al.* 1995 ; Wu *et al.* 2000). Toutefois, la MCP peut intervenir malgré l'absence des tubes polliniques (Crawford et Yanofsky. 2008). Les principales étapes du développement du tissu de transmission sont résumées dans la figure B.

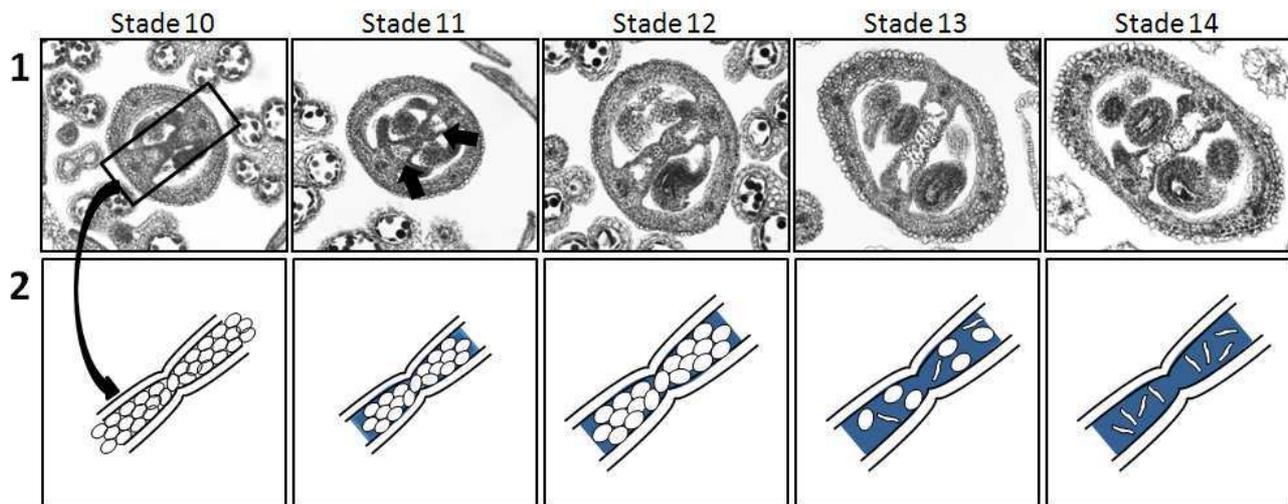


Figure B : Evolution du tissu de transmission d'*A. thaliana* au cours du développement floral.

1) Coupes transversales de pistils d'*A. thaliana* au stade de développement floral 10 à 14. Les stades ont été décrits par Smyth *et al.* 1990. Les fleurs sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μm sont réalisées. Les coupes sont colorées au *Fast Green FCF*.
2) Représentation schématique du septum lors des stades 10 à 14 du développement floral. Les cellules du tissu de transmission sont représentées par des ovales, l'épiderme du septum par deux lignes verticales et la matrice extracellulaire en bleu.

- Au Stade 11, un espace intercellulaire apparaît entre le replum et le tissu de transmission (Fig. 17 C. Flèches rouges). Les cellules du tissu de transmission commencent à sécréter une matrice extracellulaire qui est composée, entre autres, de polysaccharides acides, des protéines à arabinogalactanes et de lipides (Lennon *et al.* 1999 ; Fig. 17 D. Couleur bleue claire)
- Au Stade 12, le septum augmente en taille et les cellules du tissu de transmission continuent de sécréter de la matrice extracellulaire (Fig. 17 C et D. Couleur bleue foncée).
- A partir du Stade 13, les cellules du tissu de transmission dégénèrent et les cellules restantes sont disséminées dans la matrice extracellulaire (Fig. 17 C et D). C'est le moment de la fécondation. Les tubes polliniques progressent dans le tissu de transmission du style et du septum. Ils traversent ensuite l'épiderme du septum, progressent sur celui-ci puis atteignent le funicule. Les tubes polliniques stoppent leur

croissance lorsqu'ils déversent leurs deux noyaux gamétiques dans le sac embryonnaire d'un ovule.

- Après la fécondation (Stade 14), toutes les cellules du tissu de transmission sont en apoptose. Il ne reste que des débris cellulaires de forme aplaniée hétérogène. Dans les stades suivants, le tissu de transmission et la matrice extracellulaire vont se résorber ne laissant que les deux couches de l'épiderme du septum accolées (Stade 17).

La matrice extracellulaire du tissu de transmission est composée de carbohydrates, de glycoprotéines acides (comme les protéines à arabinogalactanes) et de lipides. Elle aurait un rôle dans la nutrition, l'adhésion et l'orientation des tubes polliniques (Lennon *et al.* 1998). De plus, des expériences sur des cellules d'*Arabidopsis* en culture ont montré l'implication des protéines à arabinogalactanes dans le processus de mort cellulaire programmée (Gao *et al.* 1999 ; Guan et Nothnagel. 2004). Ces mêmes protéines pourraient être impliquées dans la mort cellulaire observée dans le tissu de transmission (Crawford *et al.* 2007 ; Crawford et Yanofsky. 2008).

2. B.3.c Rôle des facteurs de transcription dans le développement des tissus reproducteurs

La formation et le développement du pistil d'*Arabidopsis* fait intervenir de nombreux facteurs de transcription dont l'action doit être concertée et strictement régulée (Groszmann *et al.* 2008). Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans l'identification et la caractérisation de facteurs de transcription impliqués dans la formation des tissus reproducteurs. Ceux-ci incluent SPATULA (SPT ; Alvarez et Smyth. 2002), NO TRANSMITTING TRACT (NTT ; Crawford *et al.* 2007), HECATE (HEC ; Gremski *et al.* 2007). SPT code pour un facteur de transcription de type *helix-loop-helix* (bHLH) qui est nécessaire dans le développement précoce du septum et du stigmate. Les mutant *spt* présente un défaut dans la fusion des carpelles, dans la formation des cellules du stigmate et une perte des tissus de transmission (Alvarez et Smith. 2002 ; Heisler *et al.* 2001). SPT a été décrit comme étant régulé par le gène *ETTIN* qui code pour un facteur de réponse aux hormones (Heisler *et al.* 2001). NTT code pour un facteur de transcription de type doigt de zinc qui est exprimé spécifiquement dans le tissu de transmission. Le mutant *ntt* ne produit pas de matrice extracellulaire et les cellules du tissu de transmission ne dégèrent pas (Crawford *et al.* 2007). En conséquence, les tubes polliniques ont des difficultés lors de leur progression et ne peuvent féconder que les ovules de la partie la plus apicale du pistil. Les facteurs de transcription bHLH HEC1, HEC2 et HEC3 ont quant à eux la capacité de former des

hétérodimères avec SPT dans le système double hybride chez la levure. Ces trois facteurs semblent de bons candidats pour conférer à SPT sa spécificité d'action dans les carpelles. Les mutants pour les gènes *HEC* présentent des défauts dans le développement du tissu de transmission, du septum et du stigmate. Cela a pour conséquence de réduire la fertilité (Gremski *et al.* 2007).

2. B.3.d Identification d'inhibiteurs de protéases à domaine Kunitz dans les tissus reproducteurs femelle

Depuis plusieurs années, des inhibiteurs de protéases ont été détectés dans le style des fleurs. Ainsi, Atkinson et collaborateurs ont mis en évidence la présence de deux inhibiteurs de protéases à sérine (*potato II inhibitor*) dans le style des fleurs de tabac. Leurs présences ont été confirmées par hybridation *in situ* et leur expression a la particularité d'être modulée en fonction du développement. Les auteurs concluent que ces inhibiteurs auraient un rôle dans la protection des fleurs contre les pathogènes et également un rôle alternatif au cours du développement floral (Atkinson *et al.* 1993). Cette famille d'inhibiteur est aussi retrouvée dans les inflorescences de *Solanum americanum*. Les transcrits SaPIN2a et SaPIN2b sont exprimés dans le stigmate, le tissu de transmission du style, les cellules nucellaires de l'ovule et les tissus conducteurs. Tous ces tissus subissent une dégénérescence au cours du développement suggérant une fonction de ces inhibiteurs dans le contrôle de la mort cellulaire (Sin et Chye. 2004 ; Chye *et al.* 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs équipes se sont intéressées aux transcrits spécifiques de certains organes ou tissus de la fleur. Dans une étude, Tung et collaborateur ont réalisé une lignée transgénique où le tissu de transmission et le stigmate sont absents. Dans un second temps, les profils d'expression des transcrits du sauvage et du mutant ont été comparés suite à une analyse par *microarray*. Ces travaux ont donc permis de caractériser les transcrits spécifiques du tissu de transmission et du pistil. On retrouve des transcrits impliqués notamment dans la formation de la cuticule du stigmate, la modification et le remodelage de la matrice extracellulaire ou encore dans la défense contre les pathogènes (Tung *et al.* 2005). Dans la dernière catégorie, il y figure un inhibiteur de protéase de type Kunitz. La présence de ce transcrit dans la fleur a été confirmée par deux autres études (Scutt *et al.* 2003 ; Peiffer *et al.* 2008). Leur fonction est inconnue au cours du développement floral.

3 Les protéines WSCP, représentantes atypiques des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz

Chez les plantes, la photosynthèse est réalisée grâce à l'action de protéines capables de fixer la chlorophylle (Chl). Ces protéines se retrouvent au niveau des membranes thylacoïdiennes des chloroplastes où elles constituent entre autres les photosystèmes I et II, acteurs principaux du transfert d'électrons. Ces complexes sont pourvus d'une structure fortement hydrophobe (Nelson et Yocum. 2006), responsable de l'interaction avec la chlorophylle.

Dans les années 60, Yakushiji et collaborateurs sont parvenus à purifier sans aucun détergent une protéine hydrosoluble liée à la Chl (Yakushiji *et al.* 1963). Cette protéine fut nommée WSCP pour Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein. Les protéines WSCP constituent une famille qui se scinde en deux classes : (I) de type *Chenopodium album* et (II) de type *Brassica* (Sato *et al.* 2001). La classe I voit son spectre d'absorption changer suite à une irradiation à la lumière blanche alors que la classe II ne présente aucun changement après illumination (Yakushiji *et al.* 1963 ; Murata *et al.* 1971)

3. A La classe I

3. A.1 La photo-conversion de CP668 en CP740 de *Chenopodium album*

Les WSCP de classe I sont retrouvées chez de nombreuses espèces végétales comme *Atriplex*, *Polygonium*, *Chenopodium* ou encore *Amaranthus* (Takamiya 1973). La première protéine appartenant à cette classe a été purifiée chez *Chenopodium album* et fut nommée CP668 (CP pour Chlorophyll Protein) en raison du pic d'absorption maximal dans le rouge à 668 nm (Fig. A). Après illumination de CP668 en solution aqueuse et en présence de lumière blanche, le pic d'absorption diminue et l'on voit apparaître deux nouveaux pics à 740 nm et 564 nm (Yakushiji *et al.* 1963 ; Noguchi *et al.* 1999 ; Fig. C). La protéine photo-convertie est alors appelée CP740. La conversion de CP668 en CP740 nécessite donc une photo-excitation mais nécessite également la présence d'oxygène (Hagar et Hiyama. 1979). Des études ont montré que cette photo-conversion était dépendante du pH de la solution aqueuse et que la présence d'agent réducteur permettait d'inverser le processus (Oku et Tomita. 1975 ; Hagar et Hiyama. 1979).

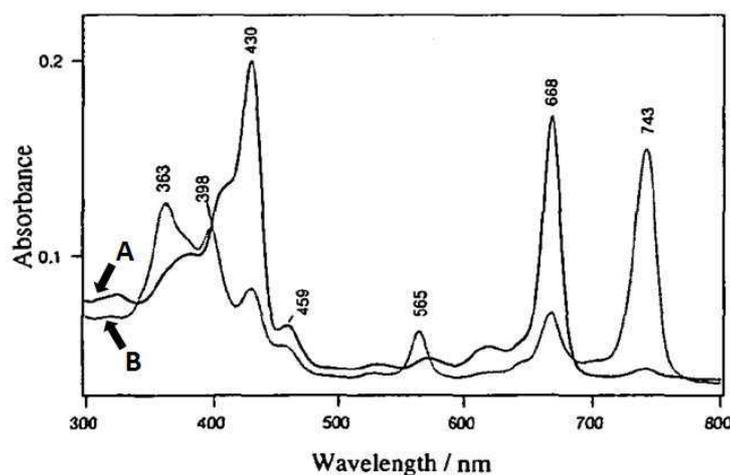


Figure C : Spectre d'absorption des complexes multimériques CP668 (A) et CP743 (B) liés à la chlorophylle

CP668 et CP743 ont été purifiés à partir de feuille de *Chenopodium album*. La figure est adaptée d'un article de Nogushi *et al.* de 1999.

Récemment, l'analyse des pigments présents chez CP740 a permis de comprendre les changements opérant lors d'une illumination à la lumière blanche de CP668. En effet, la Chl photo-excitée réagit avec les molécules d'oxygène pour former des espèces réactives de l'oxygène comme le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (Fig. D 1 pour la structure de la Chl). Les espèces réactives de l'oxygène produites vont alors oxyder le noyau tétrapyrrolique de la Chl qui va à son tour interagir avec un résidu R-X de la chaîne polypeptidique de CP668 pour former le supercomplexe CP740 (Hirabayashi *et al.* 2006 ; Fig. D 2).

3. A.2 Organisation de CP668

Le complexe natif CP668 a un poids moléculaire 78 kDa et contient 6 molécules de Chl a pour une molécule Chl b (Takamiya, 1973). La Chl a se différencie de la Chl b par la substitution d'un groupement méthyle en un groupement formyl sur le noyau tétrapyrrolique (Fig. D 1). CP668 est composé de sous-unités de 16 kDa ne présentant aucune homologie en extrémité N-terminale avec les WSCP de classe II (Sato *et al.* 2001). Le nombre exact de sous-unités du complexe CP668 est à ce jour inconnu. Toutefois, des données préliminaires de diffraction aux rayons X ont été obtenues sur des cristaux de CP668 de *Chenopodium album* couplés à la Chl (Ohtsuki *et al.* 2007). L'organisation tridimensionnelle des monomères de WSCP de classe I pourrait être déterminée prochainement. De plus, une équipe japonaise de l'Université de Toho semble avoir cloné l'ADNc de CP668 de *Chenopodium album*. La protéine recombinante exprimée dans les bactéries est capable de fixer la Chl *in vitro*. Ces résultats ainsi que la séquence codante n'ont pas encore été publiés (Plant Biology Abstract Center, Abstract#337).

3. A.3 Localisation de la WSCP de classe I

Une seule étude traite de la localisation des WSCP de classe I *in planta*. Cette étude, réalisée chez *C. album*, montre que ces protéines sont présentes préférentiellement dans les tiges plutôt que dans les feuilles. Par ailleurs, les protéines sont plus représentées dans les jeunes tissus que dans les feuilles matures (Takamiya. 1973). La fonction physiologique des WSCP de classe I est à ce jour inconnu, mais les WSCP pourraient être impliquées dans la synthèse et/ou la dégradation de la Chl si on en croit leur capacité à former des complexes solubles avec cette dernière (Hörtensteiner. 2006).

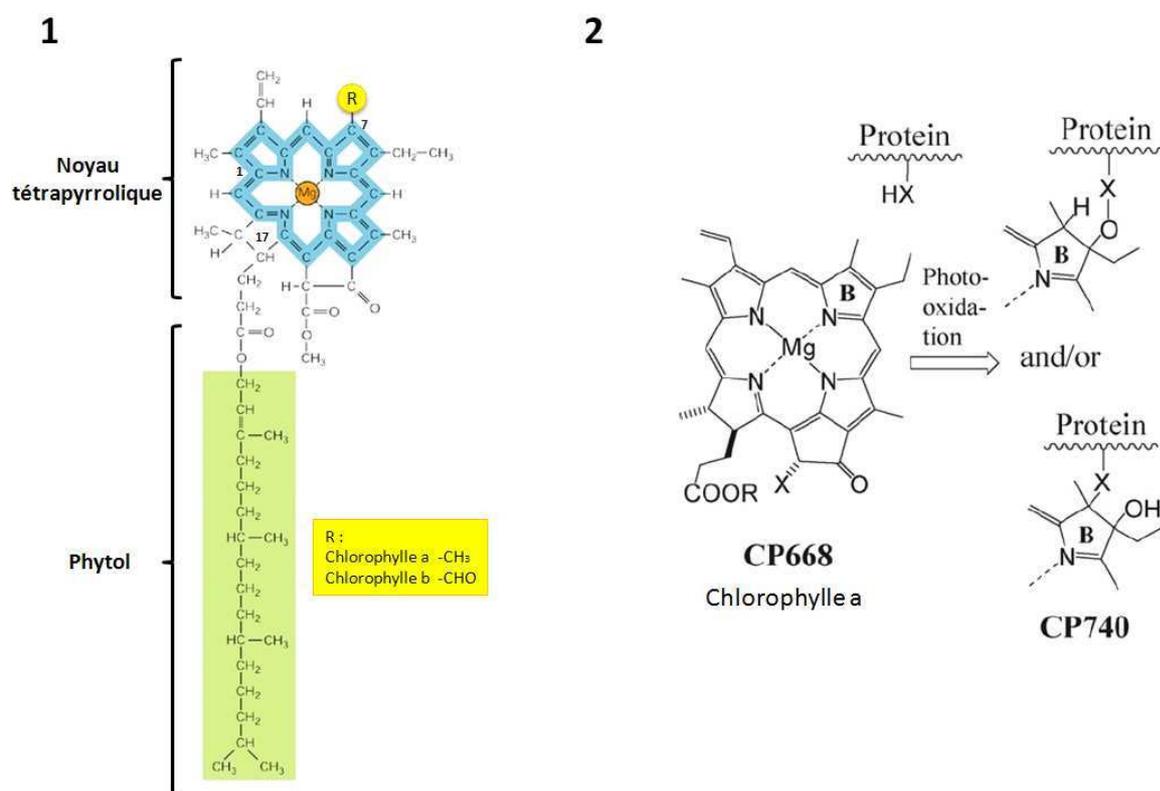


Figure D : Structure de la chlorophylle (1) et photo-oxydation de CP668 en CP740 chez *Chenopodium album* (2)

(1) Au centre, le noyau tétrapyrrolique renfermant un atome de magnésium. En C7, présence d'un groupement méthyle chez la chlorophylle a ou formyl chez la chlorophylle b. En C17, présence d'un alcool à longue chaîne, le phytol.

(2) Figure tirée d'un article de Hirabayashi *et al.* (2008) avec modifications. R : Phytol.

3. B La classe II

Les WSCP de classe II sont présents chez de nombreuses plantes de la famille des *Brassicaceae* comme par exemple le chou-fleur (*Brassica oleracea var. botrytis*), le colza (*Brassica napus*), le chou pommé (*Brassica oleracea var. capitata*) ou le navet (*Brassica rapa* ; Satoh *et al.* 2001).

3. B.1 Séquence d'adressage

Les WSCP de classe II possèdent des peptides d'adressage qui sont prédits par les programmes de bioinformatique comme étant des peptides d'adressage au système de sécrétion (Satoh *et al.* 2001). En effet, les séquences contiennent de nombreux acides aminés hydrophobes. De plus, elles respectent la règle « -1 -3 » des protéines sécrétées. C'est-à-dire que les résidus en position -1 et -3 du site de clivage doivent obligatoirement être petits et neutres pour que le clivage se produise correctement (von Heijne. 1983 ; von Heijne 1985). Coralie Halls et collaborateurs ont réalisé des expressions transitoires d'une séquence d'une supposée WSCP dans des protoplastes de tabac. Il s'avère que la protéine exprimée co-localise avec le contrôle (BP80) dans les compartiments prévacuolaires (Halls *et al.* 2006). Avant de se retrouver dans ces compartiments prévacuolaires, les protéines sembleraient transiter par le réticulum endoplasmique (Bethke et Jones. 2000). Cependant, cette hypothèse doit être confirmée car les protoplastes à l'obscurité sont dépourvus de chloroplastes et le signal observé reste diffus et peu spécifique.

Les WSCP de classe II interagissent avec la Chl a et b, pigments photosynthétiques présents uniquement dans les chloroplastes. Il semblerait donc que les WSCP soient adressés aux chloroplastes *via* le réticulum endoplasmique où elles interagiraient avec la Chl. Cet adressage particulier a été décrit récemment pour des protéines préalablement glycosylées dans le réticulum endoplasmique (Villarejo *et al.* 2005 ; Radhamony et Theg. 2006 ; Nanjo *et al.* 2006). De plus, Murata a mis en évidence la présence de complexes WSCP-Chl dans la fraction soluble des chloroplastes de *L. virginicum* purifiés sur un gradient de percoll (Travaux de thèse cités par Satoh *et al.* 2001). Nous avons obtenu au sein de notre laboratoire des résultats qui coïncident avec ceux de Murata. En effet, les protéines WSCP de *L. virginicum* fusionnées en C-terminal à la GFP (Green Fluorescent Protein) sont observées dans les chloroplastes des transformants stables d'*Arabidopsis thaliana* (Construction sous contrôle d'un promoteur fort ; Christiane Reinbothe, Edouard Boex-Fontvieille et Gabrielle Tichtinsky, résultats non publiés).

3. B.2 Le domaine Kunitz

Toutes les WSCP possèdent un motif caractéristique des inhibiteurs de protéases à domaine Kunitz à leur extrémité N-terminale (Fig. E barre horizontale noire ; Satoh *et al.* 2001). Les acides aminés de cette séquence consensus sont parfaitement conservés : [LIVM]-X-D-X-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]-X-[LIVM]-X₅-Y-X-[LIVM]. Chez les inhibiteurs de

WSCP *Raphanus sativus* var. *niger*
 BnD22 *Brassica napus*
 WSCP1 *Brassica oleracea* var. *botrytis*
 WSCP2 *Brassica oleracea* var. *botrytis*
 WSCP *Brassica oleracea* var. *capitata*
 WSCP *Brassica rapa*
 WSCP *Lepidium virginicum*
 KTI *Glycine max*

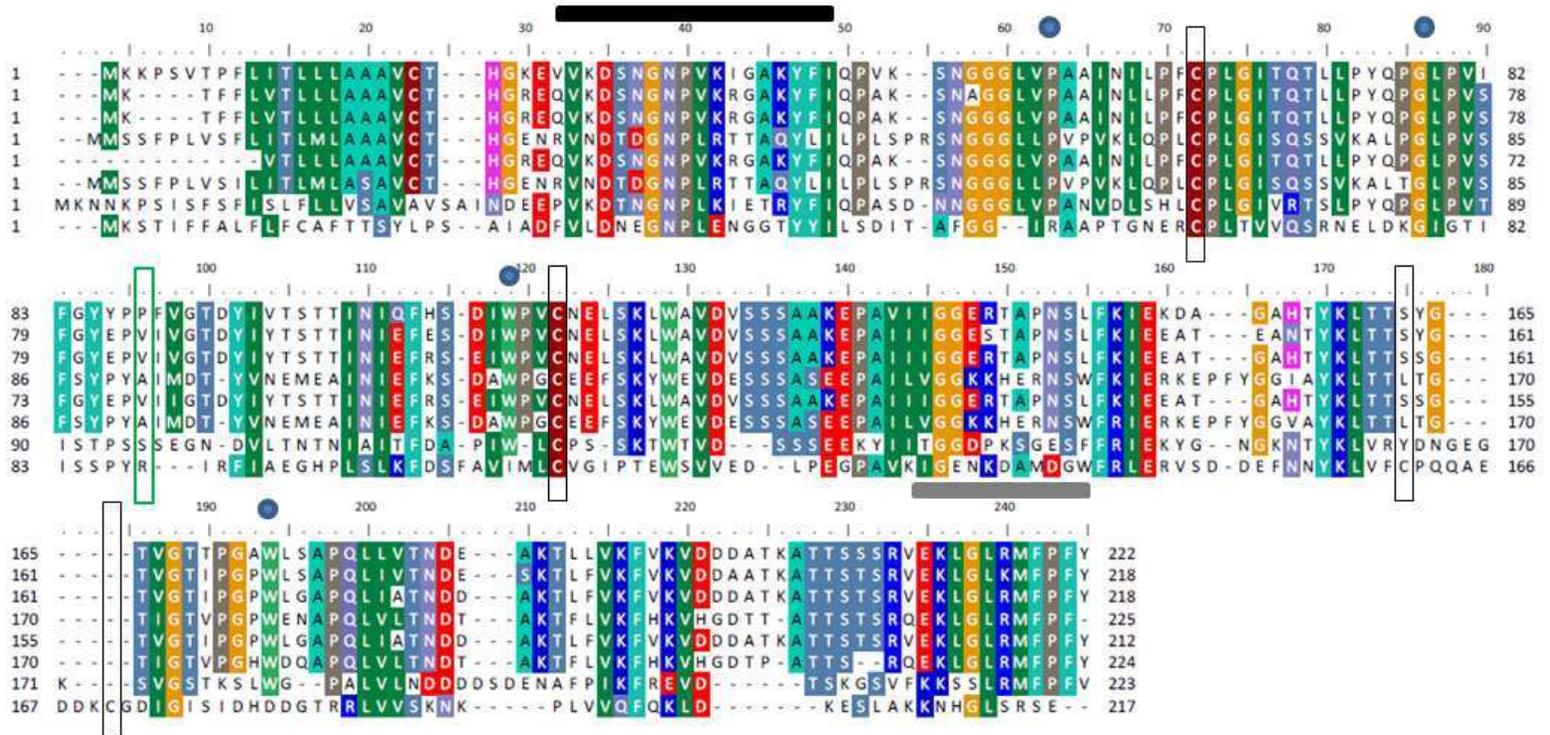


Figure E : Alignement multiple de séquences des protéines WSCP de classes II

L'alignement est réalisé à l'aide du programme ClustalW (Bioedit). STI de soja (*Glycine max*) est ajouté à l'alignement. Les acides aminés qui présentent des homologies ou des identités entre les séquences sont représentés par des carrés de couleurs. Les barres horizontales noire et grise représentent respectivement le domaine Kunitz et la région C-terminale conservée. Les cercles bleus correspondent aux acides aminés interagissant avec le noyau tétrapyrrolique de la Chl selon Horigome *et al.* 2007. Les rectangles noirs représentent les cystéines intervenant dans la formation de ponts disulfures. Il est à noter que l'inhibiteur STI à deux ponts disulfures contre un seul pour les WSCP de classe II (Horigome *et al.* 2007). Le rectangle vert représente l'Arginine impliquée dans l'inhibition des protéases à sérine comme la trypsine et la chymotrypsine chez de nombreux inhibiteur de type Kunitz.

Numéros d'accèsion des protéines alignées : WSCP (*Raphanus sativus* var. *niger*), BAB72020 ; BnD22 (*Brassica napus*), CAA46591 ; WSCP1 (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), BAA32820 ; WSCP2 (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*), BAC54102 ; WSCP (*Brassica oleracea* var. *capitata*), CAA07494 ; WSCP (*Lepidium virginicum*), BAA19578 ; STI (*Soybean Trypsin Inhibitor, Glycine max*), CAA45777.

protéases à domaine Kunitz, ce sont généralement les peptides Arg-Ser ou Arg-Lys qui interviennent dans l'inhibition de la trypsine ou de la chymotrypsine. Cependant, chez les WSCP de classe II, ce motif est absent (Fig. E cadre noir ; Hung *et al.* 1994 ; Richardson 1991).

Les WSCP natives complexées à la Chl ne présentent pas d'activité d'inhibition de la trypsine ou de la chymotrypsine *in vitro* (WSCP-Chl ; Nishio et Satoh. 1997 ; Ilami *et al.* 1997 ; Kamimura *et al.* 1997). Cependant, l'activité inhibitrice des complexes WSCP-Chl n'a pas été testée sur les protéases à cystéine et à aspartate. Marie Desclos et collaborateurs ont montré une augmentation de l'activité anti-protéolytique en présence de l'hormone méthyl jasmonate mais aussi lors de carence en azote dans les feuilles de colza. Cette activité est visualisée grâce une technique s'apparentant à la zymographie après séparation des protéines en conditions dénaturantes sur gel 2D (Desclos *et al.* 2008). Les spots protéiques présentant une activité antiprotéase ont été séquencés par ESI-LC MS/MS (*Electrospray ionization liquid chromatography tandem mass spectrometry*). Ils correspondent à la protéine BnD22, protéine de la famille des WSCP de classe II (Desclos *et al.* 2008 ; Fig. E). L'activité antiprotéase des WSCP semblerait dépendre de son niveau de multimérisation ou de modifications post-traductionnelles.

3. B.3 Interaction entre WSCP de classe II et les pigments

Les WSCP de Classe II ont été purifiées pour la première fois 1971 par Murata et collaborateurs. Tout comme les WSCP de classe I, les WSCP de classe II complexées à la Chl ont été isolées en conditions natives à partir de feuilles de *L. virginicum* (Murata *et al.* 1971).

Des études *in vitro avec* la protéine WSCP de *Brassica oleracea* ont démontré sa capacité d'interaction avec des précurseurs de la Chl comme la Mg-protoporphyrine IX, la chlorophyllide a et b (Chlide ; Schmidt *et al.* 2003) dépourvus de leur queue phytol. De façon intéressante, les WSCP de classe II possèdent un motif [F/Y]-D-P-L-G-L également retrouvé chez les protéines du photosystème LHCII (*Light Harvesting Chlorophyll a/b Binding proteins* ; Green et Kühlbrandt. 1995).

La structure tridimensionnelle des WSCP de classe II été résolue par diffraction aux rayons X par une équipe Japonaise. Il s'avère que quatre acides aminés sont capitaux pour l'interaction de WSCP de *L. virginicum* avec le noyau tétrapyrrolique de la Chl : la proline 36, glycine 56 et les tryptophanes 90 et 154 (position relative par rapport au site de clivage de la

séquence d'adressage qui a lieu entre le 26 et le 27^{ème} acide aminé ; Fig. E ronds bleus ; Horigome *et al.* 2007). De plus, ces acides aminés sont tous parfaitement conservés entre les différentes protéines WSCP. La proline a une importance toute particulière dans l'interaction avec l'ion magnésium au centre du noyau tétrapyrrolique. En effet, la pheophytine, un dérivé du catabolisme de la Chl dépourvu de l'atome de magnésium, ne se lie pas avec WSCP *in vitro* (Schmidt *et al.* 2003). Les WSCP peuvent former des homotétramères où chaque sous-unité interagit avec une molécule d'eau et de Chl (Horigome *et al.* 2007 ; Fig. F 1). Les Chl sont alors densément empaquetées dans une cavité de 5300 Å³ où les queues phytol sont au centre et où les noyaux tétrapyrroliques sont associés deux à deux, face à face (Horigome *et al.* 2007 ; Fig. F 2). Au sein de cette cavité, les queues phytol génèrent une force hydrophobe probablement responsable de la tétramérisation. En effet, les précurseurs de la Chl comme la Mg-protoporphyrine IX et la Chlide, dépourvus du phytol, peuvent se lier à WSCP mais ne provoquent pas de tétramérisation (Schmidt *et al.* 2003).

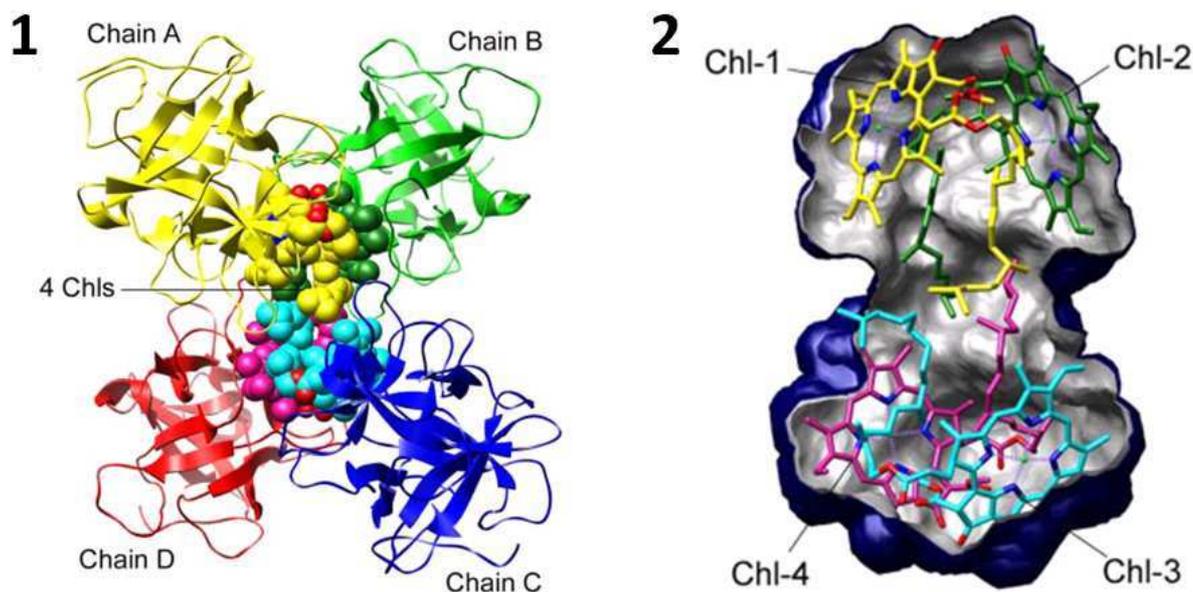


Figure F : Structure du tétramère WSCP-Chl de *Lepidium virginicum* (1) et de la cavité centrale où la Chl est empaquetée (2).

(1) Les monomères (Chain A, B, C et D) sont représentés en couleur jaune, verte, rouge et bleu. Ils forment une cavité dans laquelle les 4 Chl sont empaquetées (Ronds de couleurs). Les monomères n'ont pas d'hélice α . Les feuillettes β forment une structure centrale en forme de tonneau qui est recouverte de part et d'autre par trois doublets de feuillet beta anti-parallèle.

(2) Représentation de la cavité centrale contenant les 4 Chl et les 4 molécules d'eau. Les résidus 31-61, 86-96 et 152-156 de chaque monomère WSCP forment la cavité. Les queues phytol sont au centre et les Chl 1-2 et 3-4 sont associées par paire. Ces figures sont tirées d'un article de Horigome *et al.* de 2007.

La Chl est le principal pigment capable d'absorber l'énergie lumineuse au sein des photosystèmes. En effet, la Chl capture très efficacement les photons, ce qui permet de convertir son énergie d'excitation en un gradient électrochimique. Si cette énergie d'excitation n'est pas utilisée de manière optimale par la voie de transport des électrons des

photosystèmes, la Chl atteint alors l'état triplet. Dans cet état, la Chl peut former des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au contact de l'oxygène moléculaire. Le risque de la génération de ROS est atténué par la présence de caroténoïdes adjacents aux Chl qui dissipent une partie de cette énergie (Krieger-Liszkay. 2005).

Des études par résonance électronique paramagnétique (*electron-paramagnetic resonance*) ont montré une diminution d'un facteur 4 de la production de ROS chez les complexes WSCP-Chl par rapport à la Chl seule en solution (Schmidt *et al.* 2003). Comment les complexes WSCP-Chl peuvent-ils diminuer la production de ROS alors qu'ils ne se lient pas aux caroténoïdes ?

De nombreuses réponses ont été apportées par la structure tridimensionnelle du complexe WSCP-Chl de *L. virginicum* (Horigome *et al.* 2007). Comme nous l'avons déjà mentionné, quatre Chl sont densément empaquetées dans une cavité centrale par quatre monomères WSCP. L'oxygène ne peut physiquement pas entrer dans la cavité et ne peut donc pas être en contact avec le magnésium du noyau tétrapyrrolique responsable de la production de ROS (Horigome *et al.* 2007 ; Drezwiecka-Matuszek *et al.* 2005). Par ailleurs, une partie de l'énergie d'excitation est dissipée par l'émission de fluorescence des molécules de Chl du complexe (Sugiyama et Murata. 1978 ; Satoh *et al.* 1998). De plus, les noyaux tétrapyrroliques se font face deux à deux dans la cavité du complexe (Fig. F 2 ; Horigome *et al.* 2007). Ces dimères de Chl sont très proches (quelques angström), ce qui pourrait être à l'origine d'une dissipation de l'énergie d'excitation par transfert d'énergie entre les deux molécules (Horigome *et al.* 2007 ; Hughes *et al.* 2006 ; Renger *et al.* 2007 ; Theiss *et al.* 2007). Pour finir, une partie de l'énergie d'excitation pourrait également être atténuée par des échanges d'électrons entre les Chl et les acides aminés aromatiques de WSCP à proximité. En effet, les chaînes latérales des tryptophanes en position 90 et 154 interagissent *via* des liaisons de van der Waals avec le noyau tétrapyrrole (Horigome *et al.* 2007). Ce mécanisme de dissipation d'énergie d'excitation a déjà été mis en évidence chez une protéine fixant un chromophore, la riboflavine (Zhong et Zewail. 2001).

3. B.4 Extrémité C-terminale

Chez les WSCP de classe II, l'extrémité C-terminale est très conservée et présente le motif consensus [E/K]-K-G-L-[K/R]-M-F-P-F-Y (Fig. C barre horizontale grise). Cette région C-terminale est clivée de 10 acides aminés chez *Brassica oleracea var. botrytis* (Satoh *et al.*

1998), de 22 acides aminés chez *Brassica napus* (BnD22 ; Ilami *et al.* 1997) et de 17 acides aminés chez *Lepidium virginicum* (Horigome *et al.* 2007). La fonction physiologique de cette région est inconnue mais elle ne semble pas interférer avec les propriétés de fixation de la chlorophylle (Sato *et al.* 1998).

3. C Les fonctions hypothétiques des WSCP de classe II

3. C.1 Les plastes et les pigments végétaux

Il existe cinq types de plastes différenciés chez les végétaux. Les plus connus sont les chloroplastes. Mais il existe aussi les amyloplast, présents dans les racines et tubercules, qui sont des plastes spécialisés dans la synthèse et le stockage de l'amidon. Ils sont également impliqués dans la signalisation gravitropique au niveau des cellules de la coiffe racinaire (Morita et Tasaka, 2004). Ensuite, les chromoplastes, riches en pigments non chlorophylliens (caroténoïdes) contribuent à la coloration des fleurs et des fruits. Cette différenciation est notamment responsable du changement de couleur observé lors de la maturation du fruit. Puis, les leucoplastes, dépourvus de pigments, sont observés dans les fleurs blanches et dans les trichomes à la surface des feuilles.

Enfin, les étioplastes sont des proplastes différenciés en absence de lumière. Ce type de plastes se rencontre généralement lors d'un développement à l'obscurité (skotomorphogénèse), notamment dans le cas d'une germination sous terre ou sous un couvert végétal. Les structures membranaires internes y sont peu abondantes. Par contre on observe des structures paracrystallines majoritaires constituées de protéines, de pigments et de lipides appelées « corps prolamellaires » (Fig. G). Ces structures optimisent l'absorption des photons lors du passage à la lumière. En présence de lumière, les étioplastes se différencient en chloroplastes dans les tissus chlorophylliens (tige, feuille et fruit vert). Les chloroplastes assurent principalement la photosynthèse mais également la synthèse de tétrapyrroles (dont fait partie la chlorophylle), d'acides aminés et d'acides gras. A l'intérieur du chloroplaste, baignant dans le stroma, se trouve un réseau membranaire constitué de thylacoïdes empilés (*granum*). Ces thylacoïdes sont reliés les uns aux autres par des thylacoïdes intergranaires (Fig. G ; Lopez-Juez et Pyke. 2005). Ces membranes thylacoïdiennes sont le lieu de la collecte de l'énergie lumineuse et de sa transformation en énergie chimique.

3. C.2 Synthèse et dégradation de la chlorophylle

La Chl est le pigment majoritairement retrouvé chez les organismes phototrophes. Isolée en 1817 par Joseph Bienaimé Caventou, elle joue un rôle fondamental dans la photosynthèse en captant l'énergie lumineuse. Cette dernière sera alors transformée en énergie chimique utilisable par l'ensemble des êtres vivants. La biosynthèse de la Chl est un processus qui se déroule entièrement au sein des étioplastes et des chloroplastes. Ce processus fait intervenir quinze réactions enzymatiques dont certaines sont communes à la synthèse d'autres tétrapyrroles. L'ensemble des gènes codant pour les enzymes de cette voie a été identifié il y a seulement quelques années (Beale. 1999 ; Eckhardt *et al.* 2004).

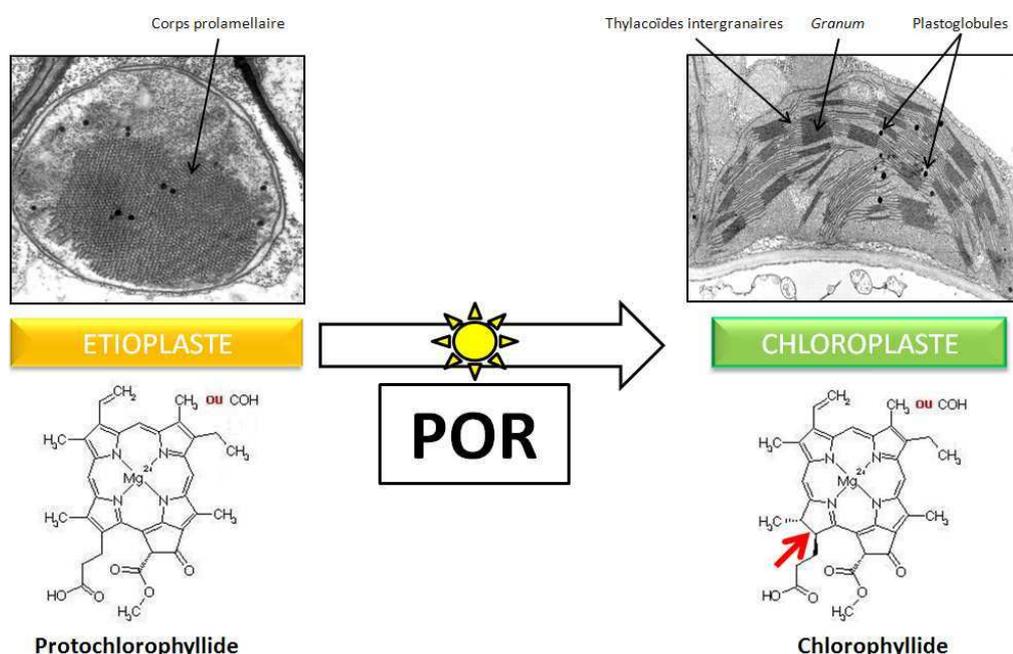


Figure G : Etape dépendante de la lumière de la synthèse d'un précurseur de la chlorophylle.

La protochlorophyllide forme un complexe ternaire avec l'enzyme POR et le NADPH au sein du corps prolamellaire des étioplastes à l'obscurité (Partie gauche). Lors du passage à la lumière, POR réduit la protochlorophyllide (Flèche rouge). Le corps prolamellaire se désintègre et les membranes s'organisent pour former les structures complexes que sont les thylacoïdes impliqués, entre autres, dans la production d'énergie chimique (Partie droite).

Une des étapes clé de cette voie est la réduction de la protochlorophyllide (Pchlde) en chlorophyllide (Chlide) par l'enzyme POR (*NADPH:protochlorophyllide oxydoreductase* ; Boardman. 1962). Il s'agit plus précisément de la réduction d'une double liaison du noyau tétrapyrrolique (Fig. G Flèche rouge ; von Wettstein. 1995). POR possède des caractéristiques originales. C'est en particulier la seule enzyme, avec l'ADN-photolyase, connue à ce jour pour avoir une activité enzymatique strictement dépendante de la lumière (Kelner. 1949; Weber. 2005 ; Fig. G). POR possède aussi la capacité de former des complexes ternaires, en se liant à son substrat (la Pchlde) et à son cofacteur (le NADPH). Au sein des étioplastes, ces complexes ternaires s'associent étroitement avec des lipides et forment la structure

caractéristique que sont les corps prolamellaires. Chez les angiospermes, POR est la seule Pchlde oxydoréductase. Du fait qu'elle soit strictement dépendante de la lumière, la biosynthèse de la chlorophylle est donc bloquée à l'obscurité au niveau de la réduction de la Pchlde. Lors d'une exposition à la lumière, la photo-réduction de la Pchlde est déclenchée. Cela entraîne la désagrégation rapide des corps prolamellaires qui permet à terme la mise en place des structures thylacoïdiennes. Une grande quantité de Chlide est alors synthétisée en un court instant. Les intermédiaires de la Chl sont des molécules extrêmement photosensibles. En effet, en présence de lumière, les tétrapyrroles libres sont capables de générer des ROS. Ces ROS sont impliqués dans des processus de dégradation cellulaire tels que la peroxydation des lipides, la dégradation des protéines ou encore l'activation des gènes de la voie de défense contre les pathogènes (Overmyer *et al.* 2003 ; Apel et Hirt. 2004). Ces processus révélateurs d'un stress photooxydatif, conduisent à un arrêt de la croissance pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

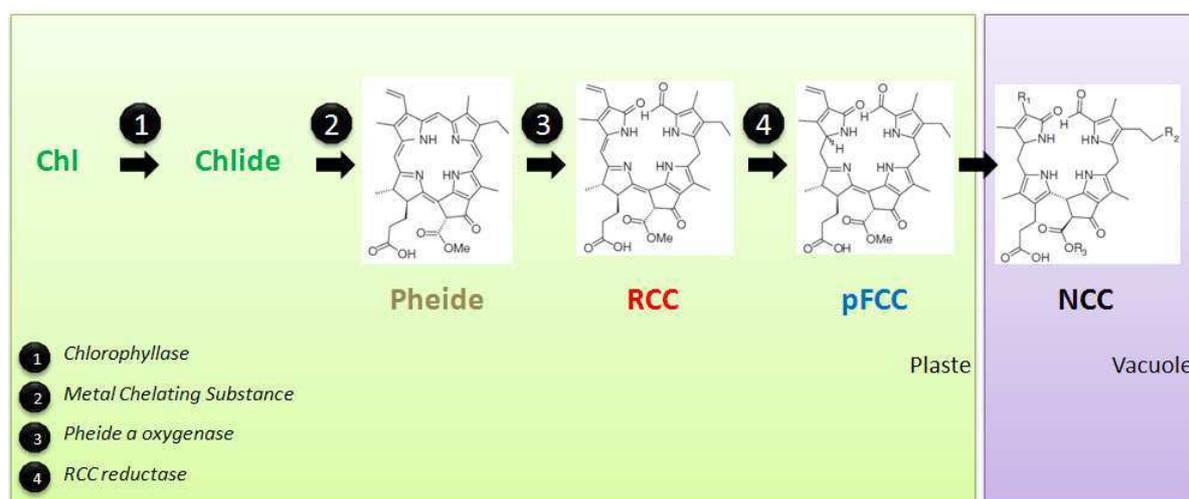


Figure H : Voie de dégradation de la chlorophylle dans les plates des plantes supérieures.

La première partie de la voie de dégradation de la chlorophylle se déroule dans les plastes où elle est catabolisée en pFCC par 4 enzymes situées au niveau de la membrane interne. Une partie des figures sont issues d'un article de Hörtensteiner de 2006. Chl : Chlorophylle ; Chlide : Chlorophyllide ; Pheide : Pheophorbide ; RCC : Red Chlorophyll Catabolite ; pFCC : Blue Fluorescent Catabolite ; NCC : Nonfluorescent Chlorophyll Catabolite.

Lors de la sénescence foliaire, la dégradation de la Chl est un marqueur de la transformation des chloroplastes en gérontoplastes. Les gérontoplastes se différencient des autres types de plastes par leur catabolisme généralisé. Ils restent cependant intacts tout au long de la sénescence des feuilles (Matile *et al.* 1992 ; Parthier. 1988). Le développement des gérontoplastes est sous contrôle du noyau, l'expression des gènes codés par le génome plastidial semble jouer un rôle mineur voire nul (Matile *et al.* 1992). La différenciation des chloroplastes en chromoplastes s'accompagne également d'une dégradation de la Chl, d'une

destruction des membranes thylacoïdiennes et de l'accumulation de caroténoïdes (Camara *et al.* 1995).

Quatre enzymes sont nécessaires pour dégrader la Chl en un composé sans couleur dénommé *blue-fluorescing intermediate* (pFCC ; Fig. H). La queue phytol est tout d'abord retirée par la chlorophyllase pour donner la Chlide. Ce composé voit ensuite son ion Mg^{2+} chélaté par une *metal chelating substance* qui donne la pheophorbide (Pheide). La pheide est à son tour convertie en pFCC par deux réactions successives des enzymes PAO (*Pheide a oxygenase*) et RCCR (*Red Chl Catabolite Reductase*). La pFCC subit encore de nombreuses dégradations avant que l'intermédiaire *blue florescing intermediate* soit finalement stocké dans la vacuole (Fig. H ; Matile *et al.* 1999).

3. C.3 Les WSCP seraient impliquées dans le stockage transitoire d'un précurseur de la chlorophylle chez l'orge (*Hordeum vulgare*) et dans la dégradation de la Chl

Deux études menées chez l'orge au sein de notre laboratoire ont mis en évidence la présence d'une protéine FCBP (*Free Chl(ide)-Binding Protein*) qui présente une homologie avec la séquence N-terminale des WSCP. De plus, FCBP est reconnue par l'anticorps dirigé contre WSCP de *L. virginicum*. Elle s'accumule au niveau de la membrane externe des étioplastes d'orge et est importée dans ces plastes lors de la synthèse de Chlide à la lumière. L'analyse des pigments complexés à FCPB par HPLC a révélé la présence de Chlide. Nous avons émis l'hypothèse que FCPB séquestrerait la Chlide au cours du dé-étiolement juste après l'étape de réduction de la PChlide dans le corps prolamellaire et pourrait ainsi prévenir d'éventuels dégâts occasionnés par des pigments photo-excitables libres (Reinbothe *et al.* 2004 a ; Reinbothe *et al.* 2004 b).

Dans la voie de dégradation de la chlorophylle, la chlorophyllase est localisée au niveau de la membrane interne des plastes alors que la Chl est stockée au niveau des thylacoïdes (Matile *et al.* 1997). Il y a donc une séparation entre l'enzyme et son substrat. Matile et collaborateurs ont émis l'hypothèse qu'une protéine soluble soit capable de transporter ces pigments des thylacoïdes à l'enveloppe (Matile *et al.* 1997). Ce rôle pourrait être tenu par les protéines WSCP. En effet, des expériences *in vitro* ont montré que les protéines recombinantes WSCP sont capables de retirer la Chl des membranes thylacoïdiennes. Dans ces conditions, les WSCP se multimérisent majoritairement sous la forme de tétramères en présence de Chl (Sato *et al.* 1998). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une expression des protéines WSCP lors de stress connus pour induire la

sénescence. Dans ces conditions, on peut supposer que la diminution de Chl serait la conséquence d'une dégradation (Nishio et Satoh. 1997 ; Downing *et al.* 1992 ; Reviron *et al.* 1992). De la même manière, les plastoglobules pourraient jouer ce rôle. Ce sont des structures protéo-lipidiques sphériques qui contiennent, entre autres, des protéines membranaires liées à la Chl (Fig. E). Les plastoglobules sont fréquemment retrouvés associés aux membranes des thylacoïdes et/ou à la membrane interne du plaste sous certaines conditions (Kessler *et al.* 1999 ; Guiamét *et al.* 1999). Les plastoglobules pourraient également transporter la Chl complexée à des protéines des thylacoïdes vers la chlorophyllase.

4 Présentation de la démarche expérimentale

De nombreuses études ont été réalisées en isolant des complexes natifs WSCP-Chl ainsi qu'en caractérisant l'expression des protéines WSCP en condition de stress abiotique. Cependant, leurs fonctions physiologiques *in planta* sont à ce jour très peu documentées. Nous avons souhaité aborder cette problématique en étudiant une protéine de la famille des WSCP chez *Arabidopsis thaliana*. Cette plante modèle présente plusieurs avantages. Des collections de mutants d'insertion (ADN-T) sont notamment disponibles afin de réaliser des études de génétique inverse. De plus, c'est un organisme dont l'étude par les techniques de biologie moléculaire est parfaitement maîtrisée sur le site Grenoblois.

Dans la première partie de ce travail, nous avons identifié et caractérisé en détail un homologue des WSCP de classe II chez *Arabidopsis thaliana* (appelé ensuite WSCP). Puis, nous avons exprimé la protéine WSCP recombinante ce qui nous a permis d'obtenir des anticorps dirigés contre cette protéine et d'étudier ses propriétés biochimiques *in vitro*. Tout d'abord, nous avons testé son activité d'inhibition sur des protéases à sérine, puis nous sommes intéressés à ses propriétés de multimérisation en présence de chlorophylle et de thylacoïdes. Parallèlement, nous avons suivi l'expression de WSCP en conditions normales de croissance et en conditions de stress par western blot. Les résultats préliminaires obtenus suite à ces premières expériences ont révélé une expression de WSCP dans les fleurs et dans les plantules étiolées. Nous avons donc décidé d'étudier plus particulièrement le rôle des WSCP dans ces deux tissus.

Dans la seconde partie, nous avons donc suivi en détail l'expression de WSCP au cours du développement des fleurs chez les plantes sauvages et chez trois mutants pour des facteurs de transcription. Par génétique inverse, nous avons étudié les conséquences d'une

absence de *WSCP* sur le développement floral, puis sur la progression de tubes polliniques et la formation des graines. Afin d'obtenir des indices sur les mécanismes sous-jacents aux phénotypes observés, l'interaction de *WSCP* a été testée par double hybride avec des protéases à cystéine contenant un domaine granuline.

Dans la troisième partie, nous avons déterminé la localisation de *WSCP* dans les plantules étiolées. Puis, nous avons testé l'influence des hormones, de la lumière, et de différents facteurs de transcription sur la régulation du gène *WSCP* et sur l'expression de la protéine correspondante. En définitive, les plantules sauvages et le mutant d'insertion précédemment caractérisé dans les fleurs, ont été étudiés dans diverses conditions dans le but de déterminer le rôle éventuel de *WSCP* lors de la skotomorphogénèse.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I Matériel biologique et conditions de culture

1. A Matériel végétal : matériel utilisé et conditions de culture

1. A.1 Ecotypes et lignées transgéniques

La totalité de ce travail a été réalisé chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* écotype columbia (Col-0) appartenant à la famille des *Brassicaceae*.

Lignée	Provenance	Caractéristiques
<i>wscp-Salk</i> (SALK_009681)	Salk Institute	T-DNA dans l'exon 1 (pROK2)
<i>ntt-2</i> (SALK_007406)		T-DNA dans l'exon 2 (pROK2)
<i>hec1</i> (GABI-KAT 297B10)	Universität Bielefeld	T-DNA dans l'exon1 (pAC106) Rosso <i>et al.</i> 2003
<i>hec3</i> (SALK_005294)	Salk Institute	T-DNA dans l'exon 1 (pROK2)
<i>hec1 hec3</i>	Dr Gary Ditta	(Gremski <i>et al.</i> 2007)
<i>35S::HEC1</i>		
<i>35S::HEC3</i>		
<i>pHEC1::HEC1::GUS</i>		
<i>35S::WSCP</i>	Réalisé au laboratoire	pB7WG2
<i>wscp-Salk 35S::WSCP</i>		
<i>pWSCP::GUS</i>		pKGWFS7

Tableau 1 : Lignées transgéniques utilisées dans ce travail

La lignée mutante *wscp-Salk* d'*A. thaliana* a été identifiée par Françoise Quigley et Christiane Reinbothe à partir du site internet TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* ; <http://www.arabidopsis.org>) puis commandée auprès de l'*Arabidopsis Biological Resource Center* (<http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrchrome.htm>).

1. A2 Conditions de culture

1. A.2.a Condition de lumière

Les plantules d'*A. thaliana* sont cultivées en conditions de jours longs, cela correspond à une phase de 16 h de lumière suivie d'une phase de 8 h d'obscurité.

En salle de culture *in vitro*, l'intensité de la lumière est d'environ $70 \mu\text{mol photons. m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ (Mazda Fluor 58 W), pour une température constante de 24°C. L'air est constamment renouvelé et l'hygrométrie non contrôlée.

Les cultures en terre sont réalisées en salle de culture aménagée, la température est de 24°C le jour et 21°C la nuit. L'éclairage est assuré par une combinaison de tubes fluorescents blancs (Mazda Fluor 36 W) et horticoles (Osram Fluora 36 W) délivrant une intensité lumineuse de $70 \mu\text{mol photons. m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$. L'hygrométrie est maintenue constante à 60-70%, et l'arrosage s'effectue par imbibition deux fois par semaine.

1. A.2.b Culture en terre

La culture des plantes en terre se fait sur du terreau (Motte-Domaine) préalablement imbibé d'eau, autoclavé pendant 20 min à 120°C et traité au larvicide des mouches mineures (Trigard® 0,2 g/L).

Les graines sont directement semées en terre sans stérilisation de surface préalable ; les pots ou bacs de plantation sont recouverts d'un film plastique afin de maintenir pendant environ 8 jours une atmosphère saturée en eau. Avant la mise en chambre de culture, les graines subissent une étape de stratification à 4°C et à l'obscurité pendant deux jours afin de synchroniser la germination.

1. A.2.c Culture *in vitro*

Toutes les manipulations sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire horizontal. Avant d'être semées *in vitro*, la surface des graines est stérilisée par immersion dans une solution de chlore (pastille de 3,5 g de chlore actif commercial dissoute dans 50 ml d'eau distillée) diluée au cinquième dans de l'éthanol absolu. Après 5 min d'agitation, puis décantation, la solution de stérilisation est éliminée et les graines sont lavées à l'éthanol absolu, puis séchées sous hôte pendant au moins 2 h.

Les cultures sont réalisées dans des boîtes de Pétri hautes sur milieu MS gélosé, stérilisé par autoclave (sels MS (Sigma Aldrich) 4,3 g/L ; MES 0,5 g/L ; agar 10 g/L ; pH 5,7 ajusté avec KOH 1 M). Le milieu de culture peut être supplémenté de l'antibiotique kanamycine (concentration finale de 50 mg/L) pour la sélection des plantes transformées, d'hormones ou d'inhibiteur d'hormones (pour les concentrations d'utilisation, voir tableau 2)

	Solution stock	Concentration d'utilisation
IAA	100 mM dans l'éthanol	10 μ M
ACC	10 mM dans l'eau distillée	10 μ M
EBR	420 μ M dans l'éthanol	100 nM
GA	10 mM dans l'éthanol	10 μ M
NPA	3,45 mM dans DMSO	1 μ M
AgNO₃	100 mM dans l'eau distillée	100 μ M

Tableau 2 : Hormones et inhibiteurs d'hormones utilisés dans les milieux de culture MS gélosés

1. A.2.d Test de photoblanchiment

Les graines sont semées sur du milieu MS solide (10 g/L d'agar), alignées au bas de la boîte. Après un séjour de 48 h à 4°C, les semis sont exposés 1 h à la lumière (70 μ E.m⁻².s⁻¹) pour stimuler la germination et sont mis à l'obscurité en position verticale pendant 4 jours. Les plantules étioilées, alignées les unes à côté des autres, sont alors exposées à l'horizontale sous une lumière relativement forte (120 μ mol photons. m⁻². sec⁻¹). Une photographie est prise au bout de 24 h d'exposition.

1. A.2.e Test d'émergence

Les graines sont disposées dans une boîte de Pétri haute (90 mm de diamètre et 20 mm de hauteur) puis recouverte de 23 mL de MS agar à une température de 40°C. Les graines sont recouvertes de 5 mm de milieu de culture MS après solidification du milieu. Les semis sont placés à 4°C pendant 48 h à l'obscurité, puis exposés 1 h à la lumière (70 μ E.m⁻².sec⁻¹). Enfin, les semis sont disposés à l'obscurité pour une durée de 3 à 5 jours. Une plantule est considérée comme ayant émergée lorsque sa crosse apicale affleure ou dépasse de la surface gélosée.

1. A.2.f Etude de la croissance et de la morphologie des tubes polliniques chez *A. thaliana*

Pollinisation maximale

Des fleurs avant anthèse (stade 12 d'après Smyth *et al.* 1990) sont émasculées à l'aide de pinces fines sous loupe binoculaire. 24 h après, du pollen est déposé à l'aide d'un pinceau sur le stigmate. Les tubes polliniques sont colorés au bleu d'aniline 2 h, 4 h et 6 h après pollinisation (La coloration de la callose des tubes polliniques au bleu d'aniline est décrite dans la partie 4. B). Les méthodes de pollinisation et de coloration employées permettent d'étudier le mouvement des tubes polliniques dans le pistil en fonction du temps.

Pollinisation minimale

Les fleurs sont préparées comme dans le paragraphe précédent mais cette fois-ci, les pistils sont fécondés avec 1 à 5 grains de pollen déposés avec un pinceau sous loupe binoculaire. Le lendemain, les tubes polliniques sont colorés au bleu d'aniline (voir partie 4. B). Le faible nombre de grains de pollen déposés permet d'étudier en détail la structure et le trajet des tubes polliniques dans le pistil.

1. A.2.g Distribution des graines dans le fruit suite à une pollinisation minimale

Une pollinisation minimale est réalisée comme décrite dans la partie 1. A.2.f. Les pistils fécondés sont laissés 7 jours jusqu'à formation du fruit contenant la ou les graine(s) en développement (5 au maximum). Les tissus sont ensuite décolorés par 3 bains dans l'éthanol 96%. Les graines sont alors visibles par transparence. Les fruits sont photographiés et la distribution interne des graines est déterminée à l'aide du logiciel ImageJ.

1. A.2.f Développement du septum dans les gynoecia non fécondés

Les fleurs au stade de développement 12 (Smyth *et al.* 1990) sont émasculées à l'aide de pinces fines sous loupe binoculaire. Les tissus sont inclus dans la paraffine 1, 2, 3 ou 5 jours après émasculation, puis coupés en section de 10 μm (voir dans la partie 4. B). Les cellules du septum sont étudiées après coloration des coupes au Fast Green FCF (voir partie 4. C).

1. B Manipulation génétique des plantes

1. B.1 Croisement en retour ou *backcross*

La manipulation consiste à émasculer une fleur non fécondée d'une plante sauvage du même écotype que celui de la lignée mutante, puis à déposer du pollen d'une fleur de la lignée mutante sur le pistil sauvage afin de provoquer une fécondation artificielle. La fleur utilisée comme femelle doit être à un stade de développement où le pistil est mature, prêt à accueillir les grains de pollen et surtout non fécondé.

Les plantes mutantes sont utilisées comme plantes mâles, soit donneuse de pollen, et les plantes sauvages comme plantes femelle. Il est ainsi plus facile d'éliminer les graines issues de l'autofécondation car elles ne possèdent pas le marqueur de sélection présent dans l'ADN-T.

Les graines issues de ce croisement sont récoltées à maturité puis semées sur milieu sélectif. Les plantules résistantes sont par la suite transférées en terre et testées ensuite par une analyse PCR quand la plante a suffisamment de matériel pour réaliser une extraction d'ADN.

1. B.2 Transformation stable d'*A. thaliana*

1. B.2.a Transformation via *Agrobacterium tumefaciens*

La méthode utilisée est issue d'un article de Clough et Bent paru en 1998, celle-ci est basée sur une transformation au niveau des inflorescences et nécessite des plantes en fleur et en très bon état physiologique.

Les plantes sont amenées au stade de floraison en conditions de jours longs. Les premières hampes florales sont coupées afin d'augmenter le nombre de bourgeons et donc augmenter le nombre de futures hampes. Une culture liquide d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant un vecteur de transformation portant le gène à transférer est réalisée en milieu de LB (250 mL) supplémentée d'antibiotiques (rifampicine 50 µg/mL ; gentamycine 20 µg/mL ; spectinomycine 100 µg/ml) est réalisée. Lorsque le milieu de la phase exponentielle de croissance est atteint ($DO_{600} = 0,8$), les bactéries sont sédimentées par centrifugation (10 min, 3000 g, 4°C), puis resuspendues dans une solution de saccharose 5% et Silwet-L77 0,05% de façon à obtenir une $DO_{600nm} = 0,8$, pour un volume final de 100 à 200 mL final. Cette

suspension de bactéries est transférée dans un bécher où sont plongées les parties supérieures des plantes à transformer pendant 10 sec avec une légère agitation pour une meilleure imprégnation. Les plantes sont ensuite placées sous un film plastique (afin de maintenir un haut niveau d'humidité) et disposées à l'obscurité. 24 h après la transformation, la protection plastique est enlevée et les plantes remises en condition normale de culture jusqu'à l'obtention des graines.

1. B.2.b Sélection des transformants

Suite à la transformation, 1/500 graine en moyenne a bien intégré le transgène. Pour identifier ces graines, on a alors recours au marqueur de sélection porté par l'ADN-T.

Sélection sur Kanamycine

La sélection des transformants (génération T1) a été réalisée sur milieu MS à 10 g/L d'agar contenant de la kanamycine à 50 µg/mL. Seule la première paire de feuilles des individus résistants se développe. Les plantules résistants sont alors transférées en terre.

Sélection sur BASTA®

Les graines T1 sont, dans un premier temps, semées en terre selon les conditions précédemment énoncées (partie 1.A.2). Au stade de la première paire de feuille, les plantes sont aspergées à l'aide d'un brumisateur de BASTA® (Hoeshst) à une concentration de 1,25 mL/L. L'opération est répétée deux fois avec 3 à 4 jours d'intervalle, les plantes résistants sont ensuite transférées en pot.

1. C Souches bactériennes et conditions de culture

1. C.1 Souches utilisées

Espèce	Souche	Résistance	Utilisation
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	aucune	Clonage
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1	Protéine CcdB	Amplification des vecteurs donneurs et de destination GATEWAY
<i>Escherichia coli</i>	BL21	Aucune	Surproduction de protéines
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pGC3121	Gentamycine Rifampicine	Transformation stable végétale

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées

1. C.2 Conditions de cultures solides et liquides

Pour les cultures en milieu liquide, le milieu complet Luria Broth (Tryptone 1% (p/v) ; Extraits de levures 0,5% (p/v) ; NaCl 0,5% (p/v)) est utilisé. Les cultures en milieu solide sont réalisées sur du LB gélosé (Bacto-agar 15 g/L). Les antibiotiques sont ajoutés après stérilisation et refroidissement du milieu selon le vecteur et la souche utilisés, aux concentrations usuelles décrites dans le tableau 4. Les bactéries sont mises en culture à 37°C avec une agitation à 200 rpm pour les cultures liquides. Les colonies sont obtenues par stries d'épuisement sur milieu solide. Les souches d'intérêt sont conservées sous forme de stock glycérolé à -80°C (Glycérol 20% final).

Antibiotique	Concentration finale
Ampicilline	100 µg/mL
Kanamycine	50 µg/mL
Spectinomycine	100 µg/mL
Rifampycine	50 µg/mL
Gentamycine	20 µg/mL

Tableau 4 : Concentration finale en antibiotiques utilisée dans les milieux de culture

1. D Les levures

1. D.1 Souche utilisée

Pour les tests double hybride, nous avons utilisé la souche de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (Clonetech), dont le génotype est : *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, ade2, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 ::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA ::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-LacZ, MEL1*.

1. D.2 Milieux et conditions de culture

Les levures ont été cultivées en milieu riche liquide YPDA à 30°C pendant 2 à 3 jours, et conservées dans 25% de glycérol à -80°C. La sélection des levures transformées a été effectuée sur un milieu minimum SD supplémenté par une solution « DROP OUT » contenant les composés d'auxotrophie (acides aminés et bases azotées) à l'exception de ceux permettant de réaliser la sélection (histidine et adénine)

Liste et composition des milieux utilisés pour la culture des levures :

- **Milieu YPDA** : Peptone 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, glucose 20 g/L, L-adénine hémisulfate 2 g/L, agar 10 g/L pour les milieux gélosés.
- **Milieu SD** : « Yeast Nitrogen Base » avec sulfate d'ammonium et sans acide aminé 6,7 g/L, glucose 20 g/L, agar 10 g/L pour les milieux gélosés, pH ajusté à 5,8 après l'ajout de la solution « DROP OUT ».
- **Solution « DROP OUT »** à ajouter au milieu SD (à diluer 100 fois) : L-isoleucine 3 g/L, L-valine 15 g/L, L-Adénine hémisulfate 2 g/L, L-Arginine HCl 2 g/L, L-Histidine HCl monohydrate 2 g/L, L-leucine 10 g/L, L-lysine 3 g/L, L-méthionine 2 g/L, L-phénylalanine 5 g/L, L-thréonine 20 g/L, L-tryptophane 2 g/L, L-tyrosine 3 g/L, L-uracile 2 g/L.

1. D.3 Transformation des levures

Les levures ont été transformées selon le protocole de Gietz (Gietz and Woods, 2002). Il s'agit d'une transformation par choc thermique de cellules rendues compétentes suite à un traitement à l'acétate de lithium. Les vecteurs utilisés lors de la transformation portent les gènes LEU2 et TRP1, impliqués respectivement dans la biosynthèse de la leucine et du tryptophane. La sélection des levures co-transformées par ces vecteurs se fait donc sur milieu SD supplémenté en « DROP OUT » dépourvu de ces deux acides aminés. Le protocole détaillé est disponible à l'adresse suivante : <http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/method.htm>

II Techniques de biologie moléculaire

2. A Transformation bactérienne et techniques de clonage

2. A.1 Préparation des *Escherichia coli* thermo-compétentes

Une colonie prélevée sur boîte LB (supplémentée ou non d'antibiotique) est ensemencée dans 2 mL de LB, et incubée pendant une nuit sous agitation (200 rpm) à 37°C. Cette culture est diluée au 1/100 dans 50 mL de LB puis replacée dans les mêmes conditions de culture jusqu'à obtenir un DO_{600nm} comprise entre 0,3 et 0,5. Les bactéries sont alors centrifugées à 4°C pendant 10 min à 4000 rpm. Le culot est resuspendu dans 5 mL de solution de $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 50mM froid et laissé 30 min dans la glace. Les cellules sont récupérées par une centrifugation selon les mêmes conditions et le culot est repris dans 1,7

mL de cette même solution, à laquelle 300 μ L de glycérol sont ajoutés. Les cellules compétentes sont aliquotées puis plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C .

2. A.2 Préparation des *Agrobacterium tumefaciens* thermo-compétentes

Une colonie prélevée sur boîte LB supplémentée d'antibiotiques est ensemencée dans 2 mL de YEP liquide (Peptone 10 g/L ; extrait de levures 10 g/L ; NaCl 5g/L ; antibiotiques). La culture est incubée sur la nuit sous agitation 200 rpm à 28°C . La préculture est ensuite diluée au 1/100 dans 50 mL de YEP supplémenté d'antibiotiques puis placé à nouveau dans les mêmes conditions de culture jusqu'à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ comprise entre 0,4 et 0,5. La culture est placée 10 min dans la glace, et les bactéries sont centrifugées à 4°C pendant 10 min à 4000 rpm. Le culot obtenu est resuspendu dans 1 mL de CaCl_2 20 mM, répartie en aliquote et les tubes sont stockés à -80°C .

2. A.3 Transformation des bactéries par choc thermique

Cellules d'*Escherichia coli*

Les bactéries fraîchement décongelées sont mises en présence de 1 à 5 μg d'ADN transformant selon la compétence des cellules. L'ensemble est placé pendant 30 min dans la glace. Le choc thermique a lieu pendant 60 sec à 42°C puis les bactéries sont immédiatement transférées dans la glace pendant 10 min. Elles sont ensuite diluées dans 400 μL de LB, avant d'être incubées 1 h à 37°C . 100 μL de cette suspension sont étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé supplémenté de l'antibiotique approprié. Les boîtes sont alors placées à 37°C pendant la nuit, les transformants seront ensuite sélectionnés et analysés.

Cellules d'*Agrobacterium tumefaciens*

Les cellules compétentes sont dégelées 30 min dans la glace. Au moins 1 μg de plasmides est ajouté et le tout est maintenu 5 min dans la glace. Les tubes sont ensuite plongés dans l'azote liquide pendant 5 min, puis les bactéries sont à nouveau mises à incuber à 37°C pendant 5 min. Les bactéries sont diluées avec 1 mL de LB puis incubées pendant 3 h à 28°C pour une régénération des cellules avant leur étalement sur milieu gélosé sélectif.

2. A.4 Techniques de clonages Gateway

Cette technologie permet de cloner rapidement une séquence d'intérêt dans un vecteur dit d'entrée, puis de la transférer ensuite dans toute une famille de vecteurs dits de destination. Cette technique présente de nombreux avantages. Elle permet entre autres de réaliser en un jour le clonage d'un fragment dans n'importe quel vecteur et de transformer la construction dans les bactéries. Ces clonages contrairement à la méthode classique, n'utilisent pas d'enzyme de restriction et fonctionnent en général avec plus d'efficacité.

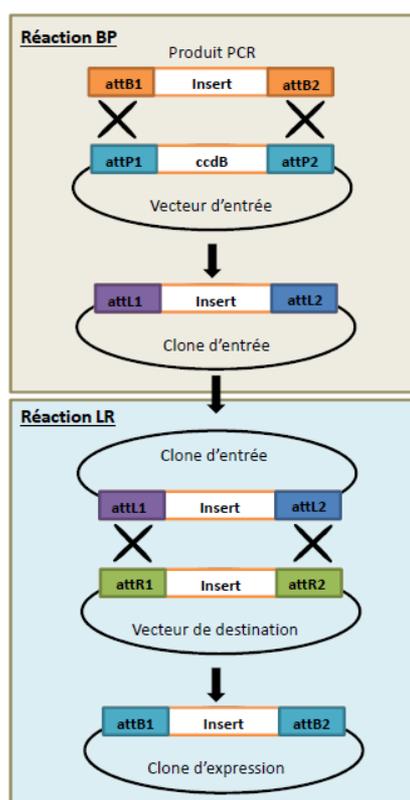


Figure 1 : Schéma des réactions Gateway BP et LR

Principe

Cette technique de clonage se base sur la capacité de recombinaison entre l'ADN du phage lambda et celui d'*E. coli* via les sites *att* lors des cycles lysogéniques. Le clonage se fait en deux étapes. Lors de la première, l'ADN d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant des amorces directes hybrides possédant une extension attB en 5'. Ce produit PCR peut recombiner *in vitro* (grâce aux sites attB portés à ses extrémités) avec les sites attP du vecteur pDONR221TM par réaction BP, conduisant au clone d'entrée (Fig. 1). Le clone d'entrée est utilisé lors d'une deuxième étape, la réaction LR, qui consiste en une deuxième recombinaison entre les deux sites attL et deux sites attR d'un vecteur de destination portant

la construction d'intérêt (figure 1). Les deux réactions de recombinaison nécessitent respectivement le mix BP Clonase II et LR Clonage II (Invitrogen) qui sont des mélanges des enzymes nécessaires à la recombinaison. Le vecteur d'entrée et les différents vecteurs de destination portent toujours entre leurs sites att, une cassette ccdB qui code pour une protéine interagissant avec la gyrase de la plupart des souches d'*E. coli*, ce qui empêche leur croissance. Lors de la recombinaison, cette cassette est perdue, ce qui permet de sélectionner que les bactéries portant la bonne construction.

Réaction de recombinaison BP et LR

50 ng de produits PCR ou 150 ng de vecteurs d'entrée sont mélangés respectivement, à 150 ng de vecteurs pDONRTM221 ou de vecteurs de destination, 2 µL de MIX BP ou LR Clonase II et du tampon TE pH 8,3 jusqu'à 10 µL final. Le mélange est brièvement vortexé puis incubé à 25°C pendant 1 h. La réaction de recombinaison est arrêtée par l'ajout de 1 µL de protéinase K (2 µg/µL) et en incubant le mélange à 37°C pendant 10 min. La moitié du volume réactionnel est utilisé pour transformer des bactéries thermo-compétentes.

2. A.5 Vecteurs utilisés et constructions réalisées

La carte des vecteurs est en annexe 1.

Vecteur	Provenance	Taille	Utilisation	Sélection bactéries levures ou plantes
pENTR At3g19390	Arabidopsis Biological Resource Center	3,9 kb	Clonage d'ADNc	<u>Kanamycine</u>
pENTR At5g43060		4 kb		
pUNI RD21		3,9 kb		
pUNI XBCP3		3,9 kb		
pDONR TM 221	Invitrogen	4,8 kb	Vecteur d'entrée dans les réactions Gateway	
pDONR AtWSCP	Christiane Reinbothe	4 kb	Clonage de WSCP d' <i>A. thaliana</i>	
pDEST TM 17	Invitrogen	6,4 kb	Surproduction de protéines chez <i>E. coli</i>	<u>Ampicilline</u>
pGADT7-GTW	Dr Gilles Vachon CEA de Grenoble	10,4 kb	Tests doubles hybrides dans la levure	<u>Ampicilline</u>
pGBKT7-GTW		9,7 kb		<u>Kanamycine</u>
pKGWFS7	Plant Systems Biology VIB-Ghent University	12,7 kb	Analyse d'activité de promoteur <i>in planta</i>	<u>Spectinomycine</u> Kanamycine
pB7WG2		10,9 kb	Surexpression <i>in planta</i> de protéines	<u>Spectinomycine</u> BASTA [®]

Tableau 5 : Vecteurs utilisés dans ce travail

Construction pour la technique de doubles hybrides

Les ADNc des protéases à cystéine et de WSCP ont été amplifiés par PCR à partir des plasmides listés dans le tableau 5. Les amorces ont été dessinées de manière ôter la séquence prédite comme codant pour le peptide d'adressage (situé en N-ter ; les amorces utilisées sont listés en annexe 2). Ces séquences sont déterminées en utilisant le programme bioinformatique TargetP disponible à l'adresse internet suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>. Les produits PCR ont été clonés dans le vecteur pDONRTM221 en effectuant la réaction GATEWAY BP, pour donner les clones d'entrée. Ensuite chaque ADNc est cloné dans les vecteurs destinations pGADT7-GTW et pGBKT7-GTW par réaction LR.

Fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS

Le promoteur du gène *WSCP* est amplifié par PCR à partir d'ADN génomique de feuille de rosette, cloné dans le vecteur pDONRTM221 à l'aide de la clonase BP puis dans un second temps dans le vecteur pKGWFS7 par réaction LR.

Construction pour la surexpression de la protéine WSCP chez *E. coli*

Les clones d'entrée pDONRTM221 avec l'ADNc WSCP entier ou dépourvu de la séquence codant pour le peptide d'adressage, ont été clonés dans le vecteur pDEST17 par réaction GATEWAY LR.

Construction pour la surexpression de la protéine WSCP chez *A. thaliana*.

Le clone d'entrée contenant l'ADNc de WSCP est cloné dans le vecteur destination pB7WG2 par réaction LR.

2. A.6 Extraction d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les plasmides ont été extraits à l'aide du kit « GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit » (Fermentas) à partir d'une culture de 2 mL en milieu LB (supplémentée en antibiotiques) sur la nuit, selon les recommandations du fournisseur.

2. A.7 Séquençage

Il est absolument nécessaire de séquencer les inserts clonés dans le vecteur d'entrée pDONRTM221 afin de s'assurer de l'absence de mutations. Celles-ci peuvent être dues à la polymérase lors de l'amplification par PCR ou être induites par l'exposition de l'ADN aux UV dans le cas d'une purification sur gel. Le séquençage est réalisé par Jean Pierre Alcaraz sur une plateforme dédiée située au pôle Biologie du Campus. La technique employée utilise des terminateurs colorés, le kit « BigDye Terminator » (Perkin-Elmer) et un séquenceur (Applied Biosystem).

2. B Méthode d'analyse des acides nucléiques

2. A.1 Extraction d'ADN d'*A. thaliana*

2. A.1.a Extraction rapide sans purification

Une feuille ou un morceau de feuille de 0,5 cm² est broyé en tube Eppendorf à l'aide d'un piston. 500 µL de tampon Edwards (Tris-HCl 200 mM pH 7,5 ; NaCl 250 mM ; EDTA 25 mM ; SDS 0,5%) sont ajoutés au broyat puis le tout est centrifugé 1 min à 13000 rpm. 350 µL de surnageant sont mis à précipiter dans un nouveau tube en présence d'un volume d'isopropanol. Le contenu est mélangé par retournement 3 à 4 fois puis laissé au repos à température ambiante pendant 4 min avant une centrifugation de 5 min à 13000 rpm. Le culot est séché sous une hotte à température ambiante pendant une heure puis repris dans 20 µL d'eau. 1 µL de la suspension d'ADN est directement utilisée pour le génotypage par PCR dans un volume réactionnel final de 25 µL.

2. A.1.b Extraction d'ADN Purifié

Environ 150 mg de matériel végétal est broyé au mortier dans l'azote liquide puis traité à l'aide du kit « illustraTM DNA Extraction Kit PHYTOPURETM » (GE Healthcare). Après l'étape de la précipitation, l'ADN est repris dans 30 µL de Tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM).

2. B.2 Southern blot

L'équivalent de 10 µg d'ADN digéré est séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,8% (p/v) sous une tension de 1 V/cm. Le gel, coloré au BET, est photographié

avant d'être traité 10 min dans un bain de dépurination (HCl 0,25 N), puis 2 fois 15 min dans des bains de dénaturation (NaOH 0,5 N ; NaCl 1,5 M) et de neutralisation (Tris HCl 0,5 M pH 7,5 ; NaCl 1,5 M) avec un rinçage rapide à l'eau distillée entre chaque solution. L'ADN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon (SensiBlotTM PlusNylon membrane, Fermentas). Le transfert s'effectue sur la nuit en présence de tampon SSC 20X (Tris Sodium Citrate 300 mM ; NaCl 3 M ; pH 7) selon Sambrook et Russell (2001). Le lendemain, la membrane est rincée 5 min dans du SSC 10X puis incubée à 80°C pendant 30 min pour fixer l'ADN génomique. Les étapes suivantes (Hybridation avec une sonde radioactive et détection) ont été réalisées par Christiane Reinbothe à l'Université de Bayreuth.

2. B.3 Réaction d'amplification en chaîne (PCR)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique *in vitro* consistant à amplifier sélectivement une séquence particulière de l'ADN par action répétée d'une ADN polymérase thermostable, Taq (*Thermus aquaticus*).

Pour les clonages, la Taq de chez Roche Applied Science (*Pwo DNA polymerase*) a été utilisée car cette enzyme possède une activité correctrice d'erreur *proof reading*. Pour le criblage des plantes mutantes, c'est une Taq recombinante de chez Bioline (*Taq DNA polymerase recombinant*) qui a été choisie car bien moins onéreuse. Le volume réactionnel standard qui est généralement de 25 µL, comprend : Tampon Taq 1X ; MgCl₂ 1,25 mM ; amorces 0,4 µM de chaque ; Taq polymérase 1 U ; ADN matrice 1 ng à 1 µg. L'ADN est dénaturé à 94°C pendant 5 min puis soumis à une amplification de 22 à 40 cycles selon la quantité d'amplicon désirée. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation pendant une minute à 94°C, une phase d'hybridation des amorces à une température qui dépend de la T_m des amorces utilisées et une phase d'élongation du brin d'ADN pendant 2 min à 72°C. L'amplification est achevée par une incubation finale à 72°C pendant 5 min pour terminer la synthèse des fragments. Les amorces sont listées en annexe 2.

2. B.4 Extraction des ARN totaux d'*A. thaliana*

Ce protocole est utilisé pour effectuer des transcriptions inverses (*Reverse transcription* : RT). Il est adapté de « *Methods in Molecular Biology* », vol. 82 : *Arabidopsis protocols ; Preparation and analysis of RNA, Current protocols* ; 4.3.1 (édité par J. Martinez-Zapater et J.Stanilas).

Les plantes sont broyées au mortier dans de l'azote liquide. L'équivalent de 500 µL de poudre est placé dans un tube Eppendorf 1,5 mL auquel un volume de tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; NaCl 100 mM ; EDTA 1 mM ; SDS 1% (p/v)), est alors ajouté. Le mélange est vortexé jusqu'à homogénéisation. Un volume équivalent de phénol/chloroforme est ajouté afin d'éliminer les protéines, l'échantillon est ensuite vortexé. Après une centrifugation de 5 min à 13000 rpm, la phase aqueuse est récupérée (phase supérieure). L'extraction au phénol/chloroforme est répétée deux autres fois, puis suivie d'une extraction au chloroforme pour ôter le phénol restant. Les acides nucléiques sont précipités par l'ajout à la phase aqueuse de 1/10 de TNE (Tris-HCl 200 mM pH 7,5 ; NaCl 1 M ; EDTA 10 mM) et de 2 volumes d'éthanol absolu froid suivi d'une incubation de 15 min à -80°C. Après une centrifugation de 5 min à 13000 rpm et à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans 100 µL d'H₂O et 100 µL de LiAc 4 M, puis laissé à précipiter pendant la nuit dans la glace. La suspension est centrifugée 15 min à 13000 rpm et à 4°C. Le culot est finalement lavé à l'éthanol 70% froid et séché à température ambiante avant d'être repris dans un petit volume d'eau distillée stérile. Le dosage quantitatif des ARN se fait par spectrophotométrie (Biophotometer, Eppendorf). Les ARN sont stockés sur le long terme à -80°C.

2. B.5 Traitement des ARN à la DNase I

L'ARN extrait contient souvent de l'ADN contaminant. Ce dernier est éliminé par deux traitements successifs à la DNase I (Euromedex), selon les recommandations du fournisseur, à raison de 2 U/µg d'ARN. L'enzyme est ensuite éliminée par une extraction au phénol/chloroforme (1:1, v/v) auquel est ajouté 0,1 volume de TNE 10X. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et les ARN sont à nouveau précipités dans deux volumes d'éthanol absolu pendant 20 sec dans l'azote liquide. Après sédimentation par centrifugation à 4°C pendant 20 min à 13000 rpm, les culot d'ARN sont rincés à l'éthanol 70%, séchés et repris dans 15 µL d'H₂O. Leur qualité est testée en déposant 300 ng d'ARN sur gel d'agarose 1% (p/v). L'absence d'ADN est vérifiée par PCR sur 300 ng d'ARN. Si une amplification est détectée, les ARN sont traités une troisième fois à la DNase I comme indiqué ci-dessus.

2. B.6 Analyse des ARN par retro-transcription et PCR semi-quantitative

Synthèse du premier brin d'ADNc

Cette technique permet de synthétiser l'ADNc correspondant à un ARN grâce à une transcriptase inverse ou ADN polymérase ARN dépendante. L'ARN (2 µg) est dénaturé 5 min à 65°C en présence de 300 pmoles d'amorces oligo dT pour l'amplification des ARN contenant une queue poly(A). Le mélange est ensuite immédiatement placé dans la glace et centrifugé brièvement. La réaction s'effectue dans du tampon RT (*First strand buffer 5x* : Tris-HCL 250 mM pH 8,3 ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM ; DTT 50 mM), en présence de dNTP 0,4 mM ; DTT 10 mM, et de 10 U de transcriptase inverse SUPERScript II (Invitrogen) pendant 2 h à 42°C. La réaction est arrêtée en chauffant les tubes durant 10 min à 72°C, 1/30^{ième} de cette réaction est utilisée pour une réaction PCR.

PCR semi-quantitative

Pour l'analyse de l'expression des gènes, les amplifications par PCR sont réalisées à partir de 1 µL d'ADNc obtenu comme précédemment. Pour chaque jeu d'amorces, le nombre de cycles à utiliser est déterminé préalablement pour se situer en phase exponentielle de l'amplification, avant saturation. L'amplification du gène d'expression constitutive ACTINE permet de contrôler la quantité d'ADNc utilisée.

2. B.7 Test double hybride

Principe

Les levures sont cotransformées avec les vecteurs pGADT7-GTW et pGBKT7-GTW vides (cassette Gateway) ou porteurs d'un insert. Les protéines exprimées par ces vecteurs sont des fusions traductionnelles. Les plasmides pGADT7-GTW et pGBKT7-GTW permettent d'obtenir une protéine chimérique fusionnée en son extrémité C-Terminale respectivement à un domaine AD (*Activation Domain*) ou à un domaine BD (*DNA Binding Domain*). Si les protéines interagissent entre elles dans la levure, le complexe formera un facteur de transcription actif capable de se fixer à l'ADN (*via* le domaine BD) et de recruter une ARN polymérase (*via* le domaine AD). Ce complexe, en se fixant à des régions promotrices, permet la transcription des enzymes impliquées dans synthèse de l'acide aminé histidine et de la base azotée adénine.

III Techniques de biochimie

3. A Surproduction de la protéine WSCP chez *E. coli*

La protéine WSCP portant une étiquette poly(His) a été induite dans la souche de bactérie BL21 à l'aide du vecteur pDEST17-WSCP. Après transformation des bactéries, une préculture sur la nuit estensemencée dans du milieu LB supplémenté d'ampicilline (LBA) à partir d'une colonie isolée. La préculture est utilisée pour inoculer 500 mL de LBA (utilisation d'un erlen de 5 L) à une DO_{600nm} de 0,05. La croissance bactérienne s'effectue sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre un DO_{600nm} de 0,6 environ. La production de la protéine recombinante est induite par addition dans le milieu de culture d'arabinose (0,1% (p/v) final) et la culture s'effectue pendant 3 h à 37°C. Les bactéries sont collectées par une centrifugation dans des pots de 250 mL pendant 20 min à 4000 rpm. Une fois le surnageant ôté, le culot de bactéries peut alors être conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

3. B Purification des protéines sur colonne d'affinité Ni-NTA Agarose en condition dénaturante

Le vecteur pDEST17 permet de cloner le gène d'intérêt en fusion traductionnelle avec une étiquette constituée de 6 histidines. L'étiquette his permet une purification de la protéine produite sur une matrice conjuguée à du nickel (Ni-NTA Agarose, Qiagen) qui fixe les histidines par liaison de coordination. La rupture de cette association peut se faire en condition dénaturante en présence d'urée de deux manières différentes, soit en abaissant le pH, ce qui déstabilise l'interaction nickel-histidine, soit en rajoutant de fortes concentrations d'un analogue de l'histidine, l'imidazole.

Le culot de bactéries est repris dans 15 ml de tampon de lyse (NaH_2PO_4 20 mM ; urée 6 M ; imidazole 20 mM ; NaCl 500 mM ; pH 7,5) auquel l'inhibiteur de protéase PMSF est ajouté à une concentration de 0,5 mM. L'échantillon est passé deux fois à la presse de French (Thermo Electron, FA-078A) puis placé sur une roue à 40 rpm pendant 1 h. Le lysat est centrifugé à 14000 rpm pendant 30 min puis le surnageant est récupéré et filtré sur membrane 0,22 μm (diamètre des pores). Le filtrat est mélangé à 500 μL de résine Ni-NTA Agarose (Qiagen) préalablement équilibrée dans du tampon de lyse et l'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Après incubation, la résine est déposée dans une colonne (Bio-Rad), puis lavée avec deux fois avec 10 mL de tampon de lavage (NaH_2PO_4

20 mM ; urée 6 M ; imidazole 30 mM ; NaCl 500 mM ; pH 7,5). Des éluions successives sont pratiquées grâce à l'addition de 6 fois 1 mL de tampon d'éluion (NaH₂PO₄ 20 mM ; urée 6 M ; imidazole 500 mM ; NaCl 500 mM ; pH 7,5). La qualité de la purification ainsi que la quantité de protéines surproduites sont estimées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12,5% en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration des gels au bleu de Coomassie.

3. C Obtention et caractérisation d'anticorps

Obtention des anticorps dirigés contre la protéine WSCP

Des anticorps polyclonaux ont été obtenus en immunisant 1 lapin par 5 injections intradermiques ou sous cutanées de 200 µg de protéines exprimées chez *E. coli* et purifiées comme décrit ci-dessus. Ce travail a été réalisé par la société Interchim (Montluçon, France).

Test de réactivité des anticorps par « Dot blot »

5 dépôts de 2 µL de solution de protéines WSCP purifiées en quantité croissantes (5 à 500 ng) sont réalisés sur une membrane de nitrocellulose. Après 30 minutes de séchage, les sites libres de la membrane sont bloqués par incubation 1 h à température ambiante avec 5 % de lait écrémé en poudre dans du TBS pH 7,4 (Tris-HCl 25 mM ; NaCl 140 mM ; KCl 3 mM)

3. D Essais d'inhibition de l'activité de la trypsine par WSCP

3. D.1 Par cinétique enzymatique

Principe

La trypsine, une sérine protéase, est incubée en présence de la protéine WSCP ou d'un inhibiteur de la protéase. Cette solution est mélangée à de la BAEE (N- α -benzoyl-L-Arg ethyl ester), substrat de la trypsine, dont un des produits de clivage absorbe à une longueur d'onde de 253 nm. Si l'Absorbance à 253 nm augmente en fonction du temps, alors la trypsine est active.

Cinétique enzymatique

Une fraction de WSCP purifiée (dans du tampon d'éluion) est mélangée à 6.10^{-6} mol de trypsine pancréatique de porc (Sigma Aldrich) à un ratio moléculaire 1:1 ou 10:1. Le

volume est ensuite ajusté à 2,5 mL avec du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Après 5 min à 25°C, 2 mL de la solution sont mélangés à 100 µL de BAEE 10 mM (dans le même tampon) et une cinétique du changement d'absorbance à 253 nm est réalisée (Spectrophotomètre Cari 100). L'inhibiteur de trypsine de graine de soja ($3 \cdot 10^{-9}$ mol/réaction ; Sigma Aldrich) est utilisé comme contrôle positif pour l'inhibition de l'activité enzymatique de la protéase.

3. D.2 Par zymographie réverse

Principe

Cette technique permet de détecter les activités antiprotéases des protéines dans un gel SDS-PAGE. Le gel en conditions dénaturantes est polymérisé en présence de gélatine, substrat des protéases. Après la migration, les échantillons sont renaturés en ôtant le SDS puis le gel est ensuite incubé dans une solution de protéases. Celles-ci clivent toutes les protéines (gélatine et produits de migration) à l'exception des inhibiteurs de protéases et de la gélatine à proximité. Les antiprotéases sont ensuite visualisées par une coloration des gels au bleu de coomassie.

Zymographie réverse

Un gel SDS-PAGE est réalisé avec de la gélatine (0,1% (p/v) ; *Gelatin from porcine skin*, Type A ; Sigma Aldrich) dans le gel de séparation. La composition, la préparation et la migration des gels SDS-PAGE sont décrites dans la partie 3. F.4. Après migration, le gel est incubé 2 fois 30 min dans une solution de Tris-HCl 0,1 M (pH 7) et de triton 2,5% (v/v). Le gel est ensuite rincé plusieurs fois à l'eau distillée puis immergé dans une solution de trypsine ou de chymotrypsine (Sigma Aldrich) 0,1% dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) pendant 30 min à 4°C et dans un second temps 90 min à 37°C. Le gel est à nouveau rincé, puis coloré au bleu de coomassie (voir la partie 3. F.5)

3. E Expérience de multimérisation de WSCP *in vitro*

En présence de thylacoïdes

Les protéines WSCP dans le tampon d'éluion (NaH_2PO_4 20 mM ; urée 6 M ; imidazole 500 mM ; NaCl 500 mM ; pH 7,5) sont diluées dans la solution de multimérisation (NaH_2PO_4 10 mM ; NaCl 0,5 M ; EDTA 1 mM ; Maltose 10 mM), la concentration en urée est amenée à 0,3 M. Les protéines sont ensuite concentrées à l'aide d'un centricon (Amilab ;

seuil de coupure 10 kDa) jusqu'à obtenir une concentration d'environ 0,5 µg/µL. 6,25 µg de protéines sont ajoutés à du tampon de multimérisation, le volume est ajusté à 50 µL, et à cette solution est immédiatement ajouté 1 µL de thylacoïdes purifié (dans du tampon R, composition décrite dans la partie 3. G ; 3 µg de protéines par µL). La réaction est réalisée à 22°C pendant 30 min sous agitation (300 rpm). Les thylacoïdes sont ensuite culotés par centrifugation à 3000 rpm durant 5 min et le surnageant est mélangé à du tampon de dépôt 4X des protéines en condition native (Tris-HCl 0,2 M pH 6,8 ; glycérol 20% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,025% (p/v)). Les échantillons sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native (100 V constant) puis les gels sont colorés au nitrate d'argent.

En présence de chlorophylle a et b

La chlorophylle a été purifiée au sein de notre laboratoire par Jean-Pierre Alcaraz à partir de tissus d'épinard. Le butanol est un solvant non miscible dans l'eau. La chlorophylle est dissoute dans du butanol à une concentration finale de 1 mM. Dans le cas présent, les thylacoïdes sont remplacés par 50 µL de la solution butanol-chlorophylle. La réaction est également réalisée à 22°C pendant 30 min sous agitation (300 rpm). La phase supérieure butanol-chlorophylle est éliminée par pipetage et la phase inférieure est mélangée à du tampon de dépôt 4X des protéines en conditions natives. Les échantillons sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native (100 V constant) puis les gels sont colorés au nitrate d'argent.

3. F Extraction des protéines et méthodes associées

3. F.1 Extraction rapide pour électrophorèse

Cette méthode permet une extraction très rapide des protéines totales de tissus de végétaux et elle limite, par sa rapidité de mise en œuvre, toute dégradation protéique éventuelle. Mais elle possède des inconvénients, celui de générer du bruit de fond lors des immunodétections et de ne pas extraire de manière optimale certaines protéines.

Le matériel végétal est broyé en fine poudre dans un mortier en présence d'azote liquide. A un volume de poudre est immédiatement ajouté un volume de tampon de dépôt de protéines 2xpp (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; glycérol 20% (v/v) ; SDS 4% (p/v) ; β-

mercaptoéthanol 10% (v/v)). Les tubes sont vortexés quelques secondes puis chauffés pendant 5 min à 100°C. Les débris cellulaires sont culottés par une centrifugation de 1 min à 8000 rpm, le surnageant est transféré dans un nouveau tube pour être dosé.

3. F.2 Extraction longue selon la méthode de Tanaka

Le matériel végétal est réduit en fine poudre par broyage dans un mortier, en présence d'azote liquide. A environ 300 mg de poudre, 600 µL de tampon d'extraction (saccharose 0,7 M ; Tris-Cl 0,5 M pH 8 ; EDTA 5 mM ; NaCl 0,1 M ; et extemporanément β-mercaptoéthanol ; PMSF 2 mM) sont ajoutés. Un volume de phénol pH 8 (par équilibration avec du Tris-HCl 10 mM) est ajouté et les tubes sont agités à température ambiante pendant 20 min. Après centrifugation pendant 5 min à 12000 rpm, la phase supérieure phénolique est récupérée et 5 volumes d'acétate d'ammonium 0,1 M (dissous dans du méthanol) sont ajoutés. Après précipitation des protéines pendant 2 h à -20°C et centrifugation pendant 5 min à 12000 rpm à 4°C, les culots sont rincés deux fois par 500 µL d'acétate d'ammonium 0,1 M (dissous dans du méthanol), puis une fois par 500 µL d'acétone 80%, séchés à température ambiante et dissous dans 100 µL de tampon de charge 2xpp. Les échantillons sont dénaturés pendant 5 min à 100°C puis dosés.

3. F.3 Dosage des protéines par la méthode de « ESEN »

Cette méthode de dosage des protéines est tirée d'un article de Asim Esen parue en 1978, elle présente l'avantage d'être peu onéreuse et d'être réalisable en présence de SDS et de β-mercaptoéthanol. 1 µL de protéines dans du tampon de dépôt (sans bleu) est déposé sur un papier Whatman d'un centimètre de côté. Pour les contrôles, 1 µL de tampon de dépôt seul et 1 µL de BSA (5 µg/µL dans la même solution), sont également déposés sur papier Whatman. Après 10 min à température ambiante, les échantillons sont placés sous agitation pendant 5 min dans une solution de fixation (isopropanol 25% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v)) puis 15 min dans une solution de coloration (isopropanol 25% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v) ; coomassie brillant blue G250 0,25 (p/v)). Le bleu coomassie est retiré du papier Whatman (les protéines déposées conserve la coloration) par trois bains dans de l'eau distillé de 2 min chacun, le premier à température ambiante et les deux suivants à 100°C. Les échantillons sont ensuite séchés sur une plaque chauffante à 250°C puis chaque carré est placé dans un tube Eppendorf contenant 1 mL de tampon d'élution (SDS 0,5% (p/v)). Les tubes

sont incubés pendant 30 min à 62°C sous agitation puis la solution est prélevée et dosée au spectrophotomètre à une absorbance de 578 nm.

3. F.4 Séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse sur gel polyacrylamide en condition dénaturante et native

En condition dénaturante, le gel se compose de 2 parties : la partie inférieure correspond au gel de séparation (acrylamide 12,5% (p/v) ; Tris-HCl 375 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% (p/v)), la partie supérieure correspond au gel de concentration (acrylamide 6,6% (p/v) ; Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% (p/v)). L'électrophorèse est réalisée en voltage constant (130 V) dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM ; glycine 240 mM ; SDS 0,1% (p/v)) (Laemmli. 1970). Après migration, les protéines sont colorées ou transférées sur membrane de nitrocellulose.

En condition native, le gel de polyacrylamide et le tampon de migration ne contiennent pas de détergeant SDS.

3. F.5 Coloration des protéines

Bleu de Coomassie

La coloration des protéines est réalisée par incubation des gels pendant 1 h à température ambiante dans une solution de bleu de Coomassie (éthanol 35% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v) ; coomassie brillant blue G250 0,15% (p/v)). La décoloration du gel est effectuée par plusieurs lavages dans une solution de décoloration (éthanol 35% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v)) jusqu'à l'obtention d'une décoloration optimale.

Nitrate d'argent

Le gel est incubé 20 min dans la solution I (méthanol 50% (v/v) ; acide acétique 5% (v/v)), 10 min dans la solution II (méthanol 50% (v/v)) puis 5 min dans l'eau distillée. Le gel est brièvement immergé dans une solution fraîche de thiosulfate de sodium (0,02% (p/v)) et rincé à l'eau bidistillée avant d'être incubé 20 min dans la solution IV (nitrate d'argent 0,1% (p/v)). Pour révéler les protéines, le gel est une nouvelle fois rincé à deux reprises avec l'eau distillée et incubé pendant quelques minutes dans la solution V (carbonate de sodium 2% (p/v) ; formaldéhyde 0,04% (v/v)) fonction de l'intensité de la coloration voulue. La

coloration des protéines est stoppée par un bain de 5 min dans la solution III (acide acétique 5% (v/v)).

3. F.6 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Un système de «sandwich» est réalisé à partir d'éponges et de papier Whatman préalablement imbibés dans du tampon de transfert (Tris 26 mM ; glycine 190 mM ; méthanol 20% (v/v)). Le gel est placé au contact d'une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, 0,45 µm) imbibée de tampon de transfert entre deux fois deux feuilles de papier Whatman et deux éponges. Le transfert s'effectue dans une cuve remplie de tampon de transfert pendant 1 h 20 à ampérage constant (250 mA) en chambre froide (4°C). Pour contrôler la qualité du transfert et l'homogénéité des quantités de protéines chargées, la membrane est colorée 1 min au rouge ponceau (rouge ponceau 0,5% (p/v) ; acide acétique 1% (v/v)), puis décolorée à l'eau distillée jusqu'à distinguer nettement les protéines. La membrane est décolorée par deux lavages dans du tampon T-TBS (Tween 20 0,1% (v/v) ; TBS : Tris-HCl 25 mM pH 7,4 ; KCl 2 mM ; NaCl 135 mM). Les sites libres de la membrane sont bloqués par incubation dans une solution de T-TBS contenant 5% de lait écrémé en poudre (T-TBS lait), pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C.

3. F.7 Immunodétection des protéines

Membrane de nitrocellulose

L'anticorps primaire dilué (1/1000° à 1/5000°) dans du T-TBS lait est incubé avec la membrane pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane est lavée par trois lavages de 10 min avec du T-TBS à température ambiante puis incubé pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué au 1/3000° dans du T-TBS lait. Après 3 lavages de 10 min avec du T-TBS, la membrane est alors placée en présence du substrat correspondant à l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire. Pour l'anticorps secondaire couplé à la HRP, la révélation s'effectue grâce au système « ECL Western Blotting » (Amersham) selon les recommandations du fournisseur. Avec l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline, la membrane est incubée quelques minutes dans du tampon de révélation NBT/BCIP (NaCl 100 mM ; Tris-HCl 100 mM ; MgCl₂ 50 mM ; 4-nitroblue tetrazolium chloride 0.5 mM ; 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate 0.5 mM, pH 9) jusqu'à apparition d'un précipité insoluble coloré sur la membrane.

Immunodétection sur lame

Le matériel végétal est préalablement inclus dans la paraffine, coupé en sections de 10 µm et disposé sur une lame de microscopie classique. La paraffine est ensuite retirée des coupes avant de réaliser l'immunodétection. La préparation des coupes est traitée ultérieurement dans la partie 4. A.2.

Pour réaliser les immunodétections, les sections de tissus doivent être traitées comme décrit dans www.ihcworld.com/protocols/epitope_retrival/citrate_buffer.htm afin d'inactiver l'action des phosphatases alcalines endogènes. Cette étape est importante car des anticorps couplés à une phosphatase sont utilisés pour révéler la présence des protéines d'intérêt. Brièvement, les coupes sont incubées pendant 40 min dans du tampon citrate (acide citrique 10 mM ; tween 20 0,05% (v/v) ; pH 6) préchauffé à 95°C. Les coupes sont ensuite placées à température ambiante pendant 20 min pour les refroidir, puis les sites de fixation non spécifiques sont bloqués 1 h avec du T-TBS contenant 5% de lait écrémé. A l'aide d'un bloc de paraffine, une séparation est tracée au milieu de la lame de microscopie, sur une partie sont déposés les anticorps anti-WSCP ou anti-RD21 (1/300^{ième} dans du T-TBS lait) et sur l'autre le sérum préimmun correspondant (1/300^{ième} dans du T-TBS lait). Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'excès d'anticorps est retiré par plusieurs lavages dans le T-TBS. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (anti-anticorps de lapin produit dans la chèvre, Sigma Aldrich) en utilisant les mêmes conditions que pour l'anticorps primaire. Après de nombreux lavages, le complexe antigène-anticorps est visualisé en présence de tampon de révélation NBT/BCIP (il faut généralement 1 à 2 min). Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée plusieurs fois, le surplus de liquide est alors éliminé puis remplacé par une goutte d'AQUATEX[®] (Merck). L'échantillon une fois recouvert avec une lamelle est prêt à être observé au microscope (Eclipse E-600, Nikon).

3. G Purification des thylacoïdes d'*Arabidopsis thaliana*

Les thylacoïdes ont été purifiés par Mohamed Karamoko et Denis Falconet.

Purification des chloroplastes intacts

Les chloroplastes des feuilles d'*Arabidopsis* sont purifiés selon la méthode de Douce & Joyard (1982). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les feuilles sont hachées en présence

de tampon de broyage (sorbitol 0,4 M ; Tricine 40 mM pH8 ; EDTA 5 mM ; BSA 1g/L) dans un broyeur à hélices, 2 à 3 fois pendant 2-3 sec (broyage à vitesse lente). Le broyat est ensuite filtré sur 4 couches de gaze puis sur une toile de bluter (50 µm de vide de maille). Le filtrat est centrifugé pendant 10 min à 3500 rpm (rotor Beckman JA-10). Les culots, enrichis en chloroplastes, sont délicatement repris dans du tampon de lavage (sorbitol 0,4 M ; MOPS/KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; MgCl₂ 2 mM) et filtrés à nouveau sur une toile à bluter pour homogénéiser la suspension. Un gradient de Percoll (Pharmacia) est préalablement préformé par centrifugation dans le rotor Beckman JA-25-5 à partir de Percoll 50% (v/v), préparé dans le tampon de lavage, centrifugé à 18000 rpm pendant 50 min. La suspension est déposée sur le gradient, puis centrifugé pendant 10 min 7500 rpm (rotor JS 7-5) afin de séparer les contaminants extraplastidiaux et les chloroplastes cassés des chloroplastes intacts. Après centrifugation, les chloroplastes brisés et le matériel non chloroplastique pénètrent peu dans le gradient de Percoll et forment une bande supérieure. Les chloroplastes intacts forment une deuxième bande bien marquée à l'intérieur du gradient préformé. Afin d'éliminer le Percoll, les chloroplastes sont dilués par 6 à 7 volumes de milieu de lavage et centrifugés 10 min à 3500 rpm (rotor Beckman JA 25). Le culot est récupéré et un deuxième lavage est effectué à 3500 rpm pendant 5 min. Les chloroplastes sont finalement remis en suspension dans un volume minimal de tampon de lavage.

Purification des membranes thylacoïdiennes

Les chloroplastes purifiés sont repris dans le tampon d'éclatement hypotonique (tampon R : MOPS/KOH 10 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 4 mM ; acide caproïque 1 mM ; PMSF 1 mM ; benzamidine 1 mM) induisant l'éclatement des chloroplastes. La solution de chloroplastes éclatés est alors placée sur un gradient discontinu de saccharose (0,6-0,93 M, soit 4 mL de chaque concentration de saccharose préparée dans le tampon R sans les inhibiteurs de protéases). Après centrifugation (rotor Aventis JS-24-15) 1 h à 20000 rpm (72000 g), 3 fractions se distinguent :

- Le culot vert contenant les thylacoïdes.
- La couche supérieure qui contient les protéines solubles présentes dans le stroma.
- L'enveloppe des chloroplastes présente à l'interface des 2 couches de saccharoses.

Le culot de thylacoïdes est remis en suspension dans le tampon R et homogénéisé avec un potter.

IV Techniques de biologie cellulaire

4. A Coloration GUS

Les tissus végétaux (rosettes, inflorescences et plantules étiolées) sont directement introduits dans le tampon de coloration (Tampon phosphate 100 mM pH 7 ; EDTA 10 mM ; X-Gluc 1 mM) et infiltrés sous vide pendant 10 min. La coloration se fait à 37°C sur la nuit. Les tissus sont ensuite décolorés par des bains successifs de 1 h dans des solutions d'éthanol à 50%, 75%, et 96%. La dernière étape peut-être répétée plusieurs fois afin d'ôter complètement la chlorophylle des tissus. Les échantillons sont placés à nouveau dans de l'éthanol 50% puis dans du glycérol 30%. Les tissus sont montés entre lame et lamelle ou stockés à 4°C, l'observation se fait au microscope (Eclipse E-600, Nikon) en lumière transmise ou sous loupe binoculaire (SZX12, Olympus). Les photos sont prises à l'aide de la caméra Olympus DP70.

4. B Coloration des tubes polliniques au bleu d'aniline

Des fleurs pollinisées sont placées durant 2 h à température ambiante dans une solution de fixation (acide acétique 25% ; éthanol 75%). Les tissus sont rincés 3 fois à l'eau distillée puis laissés sur la nuit dans une solution de NaOH 8 M. Les échantillons sont une nouvelles fois rincés à l'eau distillée 3 fois, ils sont ensuite introduits dans une solution de bleu d'aniline (bleu d'aniline 0,1% (p/v) ; K_2HPO_4 -KOH 0,1 M pH 11) pendant 3 à 5 h à l'obscurité. Les fleurs sont montées entre lame et lamelle dans de l'eau et observées au microscope sous lumière UV.

4. C Inclusions et coupes paraffines

Les tissus récoltés sont immédiatement plongés dans une solution de FAA fraîchement préparée (25 mL éthanol 100% ; 2,5 mL d'acide acétique glacial ; 5 mL de formaldéhyde 37% ; eau distillée qsp 50 mL) puis infiltrés sous vide pendant 10 min. Cette étape de fixation des tissus (grâce au formaldéhyde présent dans le FAA) se déroule durant 2 h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Les échantillons sont ensuite déshydratés par une série de bains successifs de 1 h chacun dans l'éthanol 70%, 90% et 2 fois 100%. L'éthanol est remplacé par une solution d'Histoclear II (National Diagnostics) par une série de bains successifs de 2 h chacun : 75% éthanol absolu / 25% Histoclear ; 50% éthanol absolu / 50% Histoclear ; 25%

éthanol absolu / 75% Histoclear ; deux fois 100% Histoclear. Les échantillons sont maintenant imprégnés dans une concentration croissante de paraffine (Paraplast X-TRA, Tyco Healthcare) par remplacement de la solution, chaque étape se déroule à 55 °C dans une étuve et dure au minimum 2 h : 75% Histoclear / 25% paraplast ; 50% Histoclear / 50% paraplast ; 25% Histoclear / 75% paraplast ; trois fois 100% paraplast. Les échantillons sont sortis de l'étuve, placés dans un moule de forme rectangulaire et rapidement orientés dans le sens de la longueur avant la solidification de la paraffine. Les blocs sont fixés à un support adapté pour le microtome (Microm HM 355S, Zeiss) et des séries de coupes de 10 µm sont réalisées. Les rubans obtenus sont placés sur une lame de microscopie classique et les préparations sont placées au moins 2 h à 42°C.

Pour pouvoir ensuite utiliser ces préparations, la paraffine doit être retirée. La première étape consiste à ôter la paraffine par deux bains de 10 min dans l'Histoclear II et à réhydrater les échantillons par des bains successifs de 2 min contenant une concentration décroissante d'éthanol : 100%, 75%, 50%, 25% et 0%. Les lames peuvent maintenant être utilisées pour réaliser des colorations ou des immunolocalisations.

4. D Coloration de coupes de tissus

Bleu de toluidine

Les lames sont immergées quelques secondes dans une solution de bleu de toluidine (0,5% (p/v) dans de l'eau distillée) puis rincées plusieurs fois à l'eau. Une fois le surplus de liquide éliminé, une goutte d'AQUATEX[®] est ajoutée entre lame et lamelle.

Bleu d'alcian et fast green FCF

Les lames sont dans un premier temps colorées avec du Fast Green FCF (0,2% (p/v)) dans 0,1% d'acide acétique glacial pendant 5 min puis elles sont rincées à plusieurs reprises à l'eau distillée. Ce composé colore les cellules en vert. Il est utilisé pour faire ressortir la seconde coloration. Les lames sont ensuite colorées au bleu d'alcian 8GS (0,1% (p/v)) dans 3% d'acide acétique glacial durant 30 sec. Puis elles sont rincées à l'eau distillée plusieurs fois, le surplus de liquide est alors éliminé puis remplacé par une goutte d'AQUATEX[®]. L'échantillon une fois recouvert avec une lamelle est prêt à être observé au microscope. Ce

second composé colore en bleu la matrice extracellulaire acide présente dans le septum des fleurs.

CHAPITRE I

**Identification d'un homologue des protéines WSCP
chez *Arabidopsis thaliana*, étude de ses propriétés
biochimiques et d'expression**

1 Identification chez *Arabidopsis thaliana* d'un homologue des WSCP

Notre équipe s'est intéressée au rôle d'une protéine appartenant à la famille de WSCP chez l'orge (*Hordeum vulgare* ; Reinbothe *et al.* 2004 a ; Reinbothe *et al.* 2004 b). Nous avons décidé d'étudier la fonction de ces protéines chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Nous avons commencé notre étude en identifiant des homologues par bioinformatique. Une seule protéine a présenté toutes les caractéristiques propres aux WSCP connues. Dans un premier temps, nous avons étudié ses propriétés biochimiques et les avons comparées aux autres WSCP décrites dans la littérature. Puis nous avons dans un second temps développé un anticorps dirigé contre cette protéine afin d'étudier tout d'abord son expression par immunodétection dans les différents tissus lors de la photomorphogénèse et la skotomorphogénèse, puis en conditions de stress.

1. A La protéine d'*Arabidopsis thaliana* NP_177373.1 présente le plus d'identités de séquences avec les WSCP connues.

De nombreuses protéines ont été décrites ces dernières années comme faisant partie de la famille des WSCP. Nous avons utilisé 5 de ces séquences peptidiques provenant de 4 espèces différentes pour rechercher un homologue dans le protéome d'*Arabidopsis*. La recherche bioinformatique a été menée en utilisant le programme blastp (Altschul *et al.* 1990 ; disponible sur le site internet du *Nation Center for Biotechnology Information* : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ce programme permet d'identifier les séquences protéiques présentant des homologies avec la séquence d'entrée en fonction d'un score.

Pour toutes les comparaisons réalisées, la séquence protéique NP_177373.1 obtient le meilleur score avec un nombre d'acides aminés identiques allant de 39 % avec WSCP de *Lepidium virginicum* à 64 % avec la séquence WSCP de *Brassica napus* (Tab. 6). Les séquences protéiques NP_565062.1 et NP_177476.1 donnent dans tous les cas respectivement le deuxième et le troisième score avec environ deux fois moins d'acides aminés identiques que NP_177373.1 (résultats non montrés).

Espèce d'origine	Numéro d'accension	% d'acides aminés identifiés avec NP_177373.1	% d'acides aminés homologues avec NP_177373.1
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	BAA32820	62 %	70 %
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	BAC54095	59 %	69 %
<i>Lepidium virginicum</i>	BAA19578	39 %	53 %
<i>Raphanus sativus</i> var. <i>niger</i>	BAB72020	63 %	74 %
<i>Brassica napus</i>	CAA46591	64 %	74 %

Tableau 6 : Pourcentage d'acides aminés identiques et homologues entre les protéines WSCP connues et NP_177373.1 d'*A. thaliana*. Le programme bioinformatique « blastp » est utilisé pour la recherche d'homologue des protéines WSCP connue chez *A. thaliana* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La protéine NP_177373.1 obtient dans tous les cas le meilleur score. Les protéines utilisées pour comparer à la banque de données protéiques d'*A. thaliana* sont indiquées ainsi que les % d'acides aminés identiques et homologues avec NP_177373.1.

1. B La séquence identifiée appartient à la petite famille des protéines à domaine Kunitz chez *Arabidopsis thaliana*.

La séquence NP_177373.1 est une protéine appartenant à la petite famille des protéines à domaine Kunitz qui comprend 7 membres chez *Arabidopsis* (Li *et al.* 2008). La séquence de ces protéines et de la protéine WSCP de *Lepidium virginicum* sont comparées en en figure 2 (ClustalW).

La protéine WSCP et les protéines à domaine Kunitz ont un motif caractéristique conservé à leur extrémité N-terminale qui est [LIVM]-X-D-X-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ] (Fig. 2, barre horizontale). Ce motif est parfaitement conservé à l'exception d'un changement de résidus en position 5 chez les protéines NP_177373.1, NP_565062.1 et NP_177476.1. La séquence identifiée NP_177373.1 présente de nombreuses caractéristiques communes avec la protéine WSCP de *Lepidium virginicum*, notamment, la signature [F/Y]DPLGL (Green et Kühlbrandt. 1995) des protéines du photosystème LHC (*Light harvesting Chl a/b-binding protein*). De plus, les acides aminés impliqués dans l'interaction avec la chlorophylle chez WSCP de *Lepidium* sont parfaitement conservés uniquement chez NP_177373.1 (Fig. 2 ; étoiles rouges pour la proline et les deux tryptophanes). Il est à noter que la protéine NP_565062.1 possède deux des trois acides aminés impliqués dans l'interaction avec la chlorophylle. Cependant, cette protéine a une faible probabilité d'interaction avec ce pigment. En effet, nous avons remarqué que 100 % des protéines WSCP décrites dans la littérature ont dans leur séquence les trois acides aminés indispensables à la fixation de la chlorophylle. La

protéine NP177373.1 sera dénommée WSCP dans la suite du manuscrit aux vues de l'ensemble de ces caractéristiques.

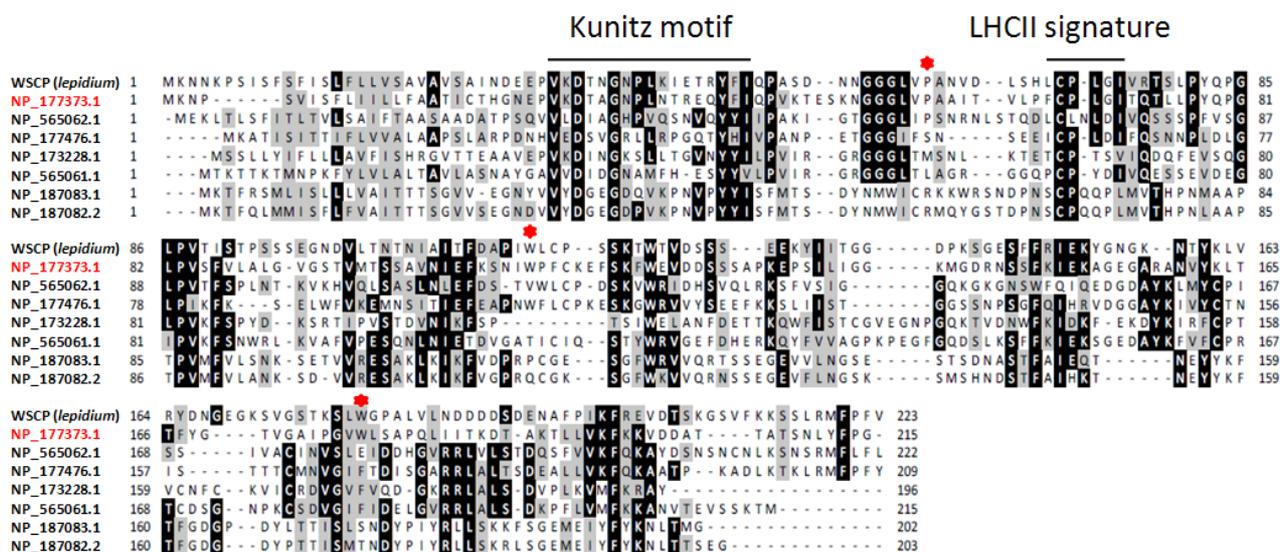


Figure 2 : Alignement multiple de séquences des protéines présentant un motif Kunitz chez *A. thaliana*. Une protéine homologue de *Lepidium virginicum* (BAA19578) connue comme étant une protéine soluble capable de fixer la chlorophylle est ajoutée dans la comparaison de séquence. L'alignement est réalisé à l'aide du programme ClustalW (Bioedit). Les carrés noirs représentent les acides aminés conservés et les carrés gris représentent les acides aminés similaires. Le domaine Kunitz ([LIVM]-X-D-X-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]) et le motif LHCII ([F/Y]DPLGL) sont délimités par une ligne horizontale. Les acides aminés impliqués dans la fixation de la chlorophylle chez WSCP *Lepidium virginicum* sont représentés par une étoile rouge (Horigome *et al.* 2007).

1. C Le modèle tridimensionnel du site de fixation de la chlorophylle du monomère WSCP d'*Arabidopsis* semble conservé.

Depuis de nombreuses années, les chercheurs japonais de l'université de Chiba disposent de cristaux de protéines WSCP purifiées à partir de tissus de *Lepidium virginicum* et de *Raphanus sativus* (Satoh *et al.* 2001). Ce n'est qu'au début de l'année 2007 que la structure du complexe WSCP-Chl par diffraction aux rayons X a été publiée (Horigome *et al.* 2007).

Chaque monomère interagit avec une molécule de chlorophylle au niveau du noyau tétrapyrrole *via* les trois acides aminés, une proline et deux tryptophanes cités précédemment. La proline 36 est en contact avec l'ion central Mg^{2+} et les deux tryptophanes avec le corps carboné de la structure (Fig. 3. A). Nous avons utilisé le logiciel gratuit Swiss-pdb viewer v3.7 qui permet de prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir d'un homologue déjà cristallisé afin de savoir si ce site d'interaction est conservé chez WSCP d'*Arabidopsis*. A cette fin, la structure de WSCP-Chl *Lepidium* a été téléchargée sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/nmdb/nmdbsrv.cgi?uid=43242>).

Cette modélisation nous a permis de comparer le site prédit de fixation de WSCP-Chl d'*Arabidopsis* à celui publié pour WSCP de *Lepidium* (Horigome *et al.* 2007 ; Fig. 3 B et C). La modélisation du site d'interaction de WSCP-Chl d'*Arabidopsis* révèle une conservation de la structure générale. En effet les feuillettes bêta conservent leur position et leur orientation (β 1 à β 5 et β 11). La position de la proline 34 et du tryptophane 154 est aussi parfaitement conservée, ainsi que l'orientation de leur chaîne latérale. En revanche, le tryptophane 87 voit l'orientation de sa chaîne latérale différer (Fig. 3 B et C).

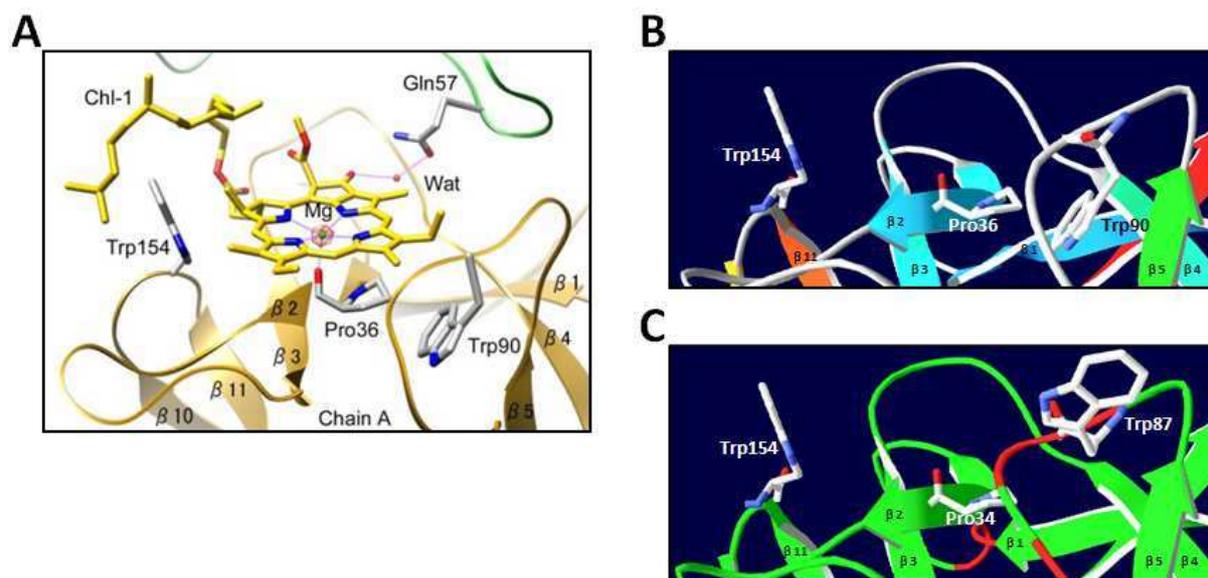


Figure 3 : Modèle structural du site d'interaction entre la chlorophylle et le monomère WSCP.

A) Structure du site d'interaction entre la chlorophylle et le monomère WSCP de *Lepidium virginicum* (Horigome *et al.* 2007 ; Figure 2). La chlorophylle est représentée en jaune avec l'ion Mg²⁺ (vert) au centre du noyau tétrapyrrole. Les feuillettes bêta sont identifiées par la lettre β suivi d'un numéro et les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans l'interaction avec la chlorophylle sont visibles (proline 36, tryptophanes 90 et 154).

B) Représentation du site d'interaction entre la chlorophylle et le monomère WSCP de *Lepidium virginicum* par le programme Swiss-PdbViewer v3.7 à partir des données publiées par Horigome *et al.* 2007.

C) Modèle structural du site d'interaction entre la chlorophylle et le monomère WSCP d'*Arabidopsis*. En utilisant la structure cristalline de WSCP de *Lepidium virginicum* et la séquence en acides aminés de WSCP d'*Arabidopsis*, un modèle structural a été obtenu avec le programme Swiss-PdbViewer v3.7.

2 Etude des propriétés biochimiques de la protéine WSCP

2. A Expression chez *E. coli* et purification de la protéine WSCP

Nous avons voulu étudier les propriétés de multimérisation et d'inhibition des protéases de WSCP *in vitro*. Pour réaliser ces expériences, il nous a fallu dans un premier temps surproduire la protéine. Nous avons opté pour la méthode de surproduction d'une protéine recombinante chez *E. coli* suivie d'une purification des protéines étiquetées d'une queue poly(his) sur colonne d'affinité.

La séquence du peptide d'adressage a été prédite par le logiciel TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) comme ayant 23 acides aminés. Il nous a paru important de déléter cette séquence car celle-ci présente de nombreux acides aminés hydrophobes pouvant altérer les propriétés biochimiques de la protéine. L'ADNc dépourvu de la séquence d'adressage a été cloné dans le vecteur d'expression pDEST17 par la méthode Gateway (cf. matériels et méthodes).

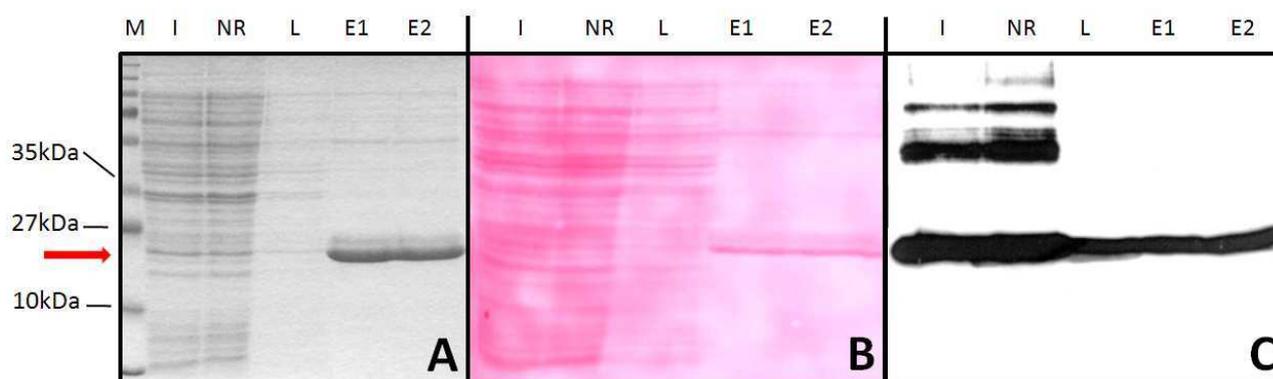


Figure 4 : Production et purification de la protéine WSCP.

La production de la protéine WSCP étiquetée histidine est induite en présence d'arabinose chez *E. coli* (puits I). Après lyse des cellules, les protéines recombinantes sont purifiées sur colonne de nickel en conditions dénaturantes (puits NR à E2). M : marqueur de poids moléculaire ; I : induction de l'expression de WSCP ; NR : protéines non retenues ; L : lavages ; E : élution.

Les protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie après séparation sur gel SDS-PAGE (A). Les protéines transférées sur membrane de nitrocellulose sont colorées au rouge ponceau (B) et les protéines recombinantes sont immunodétectées par western blot avec l'anticorps anti-histidine (C).

De nombreuses conditions de culture ont été expérimentées afin d'obtenir des protéines recombinantes dans la fraction soluble lors de l'induction. Des changements de température, du milieu et des conditions d'induction ont été testés sans succès. La protéine est toujours retrouvée dans la fraction insoluble sous forme de corps d'inclusion (résultats non montrés). Nous avons opté pour une purification de la protéine en conditions dénaturantes en présence d'urée 6 M dont les principales étapes sont résumées dans la figure 4.

Une fraction des principales étapes de la purification a été analysée par SDS-PAGE. Après coloration au bleu de Coomassie (fig. 4 A), aucune protéine ne semble être surexprimée (puits I). Cependant, pour les puits correspondant aux éluions (E1 et E2), une bande à la taille attendue (23 kDa) est visible avec quelques protéines contaminantes de plus haut poids moléculaire. Afin de s'assurer de la spécificité des bandes observées précédemment, les protéines après séparation SDS-PAGE ont été transférées sur membrane de nitrocellulose, colorées au rouge Ponceau (Fig. 4 B) et les protéines étiquetées sont immunodétectées par western blot avec un anticorps anti-histidine (Fig. 4 C). Les bandes observées dans la figure 3A correspondent bien à la protéine WSCP étiquetée. Par ailleurs, des bandes de plus haut poids moléculaire, environ 50 et 75 kDa, sont également détectées (puits I et NR). Il pourrait

s'agir de multimères non dissociés lors de l'étape de dénaturation des protéines précédent le dépôt sur gel.

Les différentes conditions mises au point nous ont permis d'obtenir de grandes quantités de la protéine recombinante : environ 15 mg par litre de culture.

2. B La protéine WSCP se multimérise en présence de thylacoïdes et de chlorophylle *in vitro*

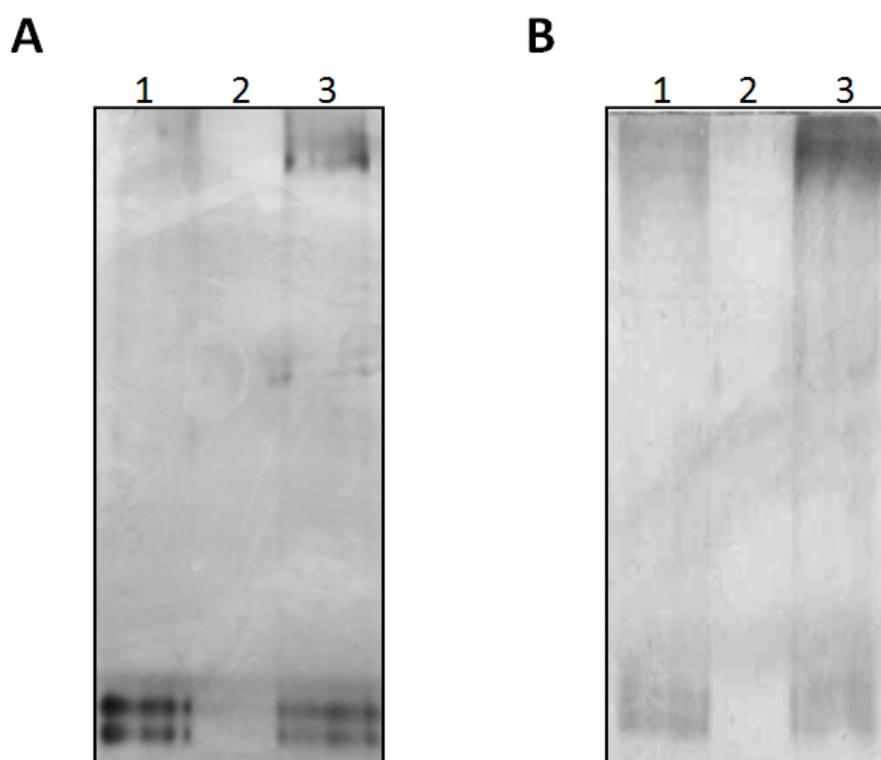


Figure 5 : Expérience de multimérisation de la protéine WSCP en présence de thylacoïdes (A) ou de chlorophylle (B).

6,25 μg de protéines WSCP sont incubées seules (1), et en présence de 3 μg de protéines de thylacoïdes ou 1 mM de chlorophylle (3). Le tampon de multimérisation contenant la chlorophylle ou des thylacoïdes est incubé seul pour s'assurer de la spécificité des bandes observées (2). Après incubation, la fraction soluble est récupérée par centrifugation, séparée par électrophorèse en condition native puis le gel est coloré au nitrate d'argent.

Pour réaliser cette expérience, il nous a fallu changer le tampon d'élution des protéines par un tampon dit « de multimérisation » contenant 300 mM d'urée. Les protéines WSCP sont ensuite mélangées au milieu réactionnel contenant des thylacoïdes ou de la chlorophylle solubilisée dans du butanol. La concentration en urée devient négligeable lors de l'ajout du milieu réactionnel, permettant ainsi la renaturation des protéines. Une partie d'entre elles aura le bon repliement et sera à même d'avoir une activité biochimique. Après une incubation de 30 min, le surnageant est ensuite séparé par gel PAGE puis coloré au nitrate d'argent (Fig. 5).

La protéine WSCP est principalement sous sa forme monomérique en absence de thylacoïdes ou de chlorophylle (A et B, puits 1), une bande de faible intensité correspondant à des multimères est toutefois visible dans la partie supérieure du gel. Cette propriété des protéines WSCP à former des multimères en solution a déjà été reportée dans la littérature (Satoh *et al.* 1998). En présence de thylacoïdes seuls, une bande de très faible intensité est observée à approximativement la moitié de la distance de migration (Fig. 5 A, puits 2). Cela correspond à une protéine décrochée des membranes thylacoïdiennes lors de l'incubation. Celle-ci se retrouve également dans le puits 3 et peut-être considérée comme non spécifique. La forme monomérique de WSCP diminue en présence de thylacoïdes et de chlorophylle pour laisser place à la forme multimérique (Fig. 5 A et B, puits 3). Il est fort probable que la bande observée soit un homotétramère. En résumé, WSCP peut donc s'associer en multimères, association favorisée par la chlorophylle ou les thylacoïdes.

2. C La protéine WSCP n'inhibe pas les protéases à sérine *in vitro*

Il nous a paru intéressant de tester les propriétés d'inhibition des protéases à sérine par WSCP d'*Arabidopsis in vitro*. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, la famille des protéines WSCP contient un domaine Kunitz N-terminal retrouvé chez les inhibiteurs de cette classe de protéases (Fig. 2 ; Satoh *et al.* 2001). D'autres équipes n'ayant pu détecter cette activité avec la forme tétramérique couplée à la chlorophylle, nous avons décidé de voir si la forme monomérique présentait cette activité (Ilami *et al.* 1997 ; Nishio et Satoh. 1997)

2. C.1 La protéine WSCP n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de la trypsine

L'activité enzymatique de la trypsine de pancréas d'origine porcine est testée expérimentalement en suivant par spectrométrie l'apparition du produit de clivage du BAEE (Benzoyl-L-arginine ethyl ester). Dans la figure 6 A, le clivage de la BAEE par la trypsine provoque une variation de l'absorbance $\Delta\text{Abs}_{254\text{nm}}=0,023/\text{min}$. Comme contrôle positif de l'inhibition, la trypsine est préalablement incubée avec la protéine STI (*Soybean Trypsin Inhibitor*) au même ratio molaire avant d'être mis en présence du substrat. STI est un inhibiteur de la trypsine ayant un domaine Kunitz comme celui des WSCP. Comme attendu en présence de STI, l'activité trypsique est inhibée (Fig. 6 B, pente nulle). La protéine WSCP a été mélangée de la même manière avec la protéase à un ratio moléculaire 1:1 ou 10:1 avant d'être mise en présence du substrat. Les variations de la $\text{DO}_{254\text{nm}}$ obtenue en figure 6 C et 6 D sont quasiment identiques à celles obtenues avec la trypsine seule. Dans nos conditions

expérimentales, la présence de WSCP n'influence donc pas l'activité de la trypsine ($\Delta\text{Abs}_{254\text{nm}}$ étant de 0,026/min pour le ratio 1:1 et de 0,023 pour le ratio 1:10).

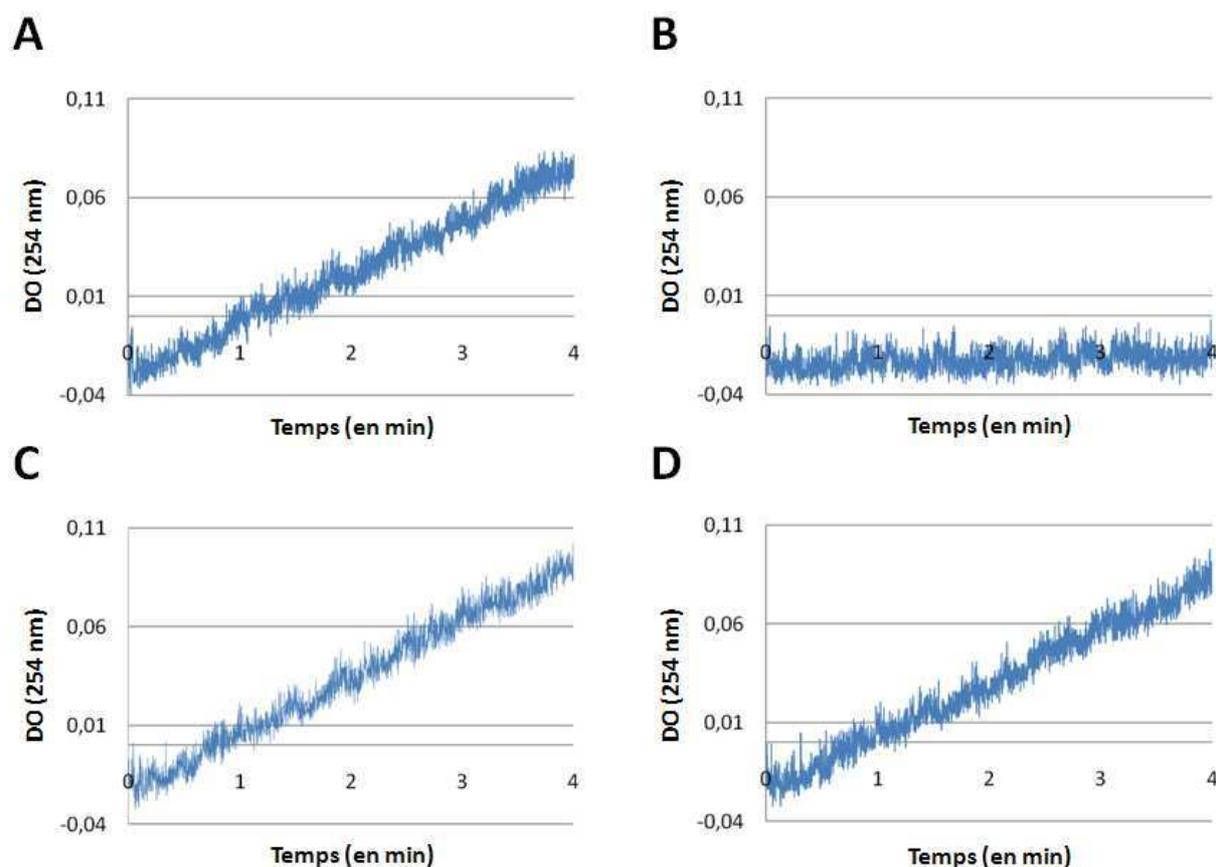


Figure 6 : Essais d'inhibition d'activité de la trypsine par la protéine WSCP d'*A. thaliana*.

L'activité enzymatique de la trypsine est réalisée en présence de BAEE comme substrat (A). Le produit de clivage du substrat absorbe à 253 nm reflétant ainsi l'activité de la trypsine. Un inhibiteur protéique de la trypsine (STI pour *Soybean Trypsin Inhibitor*) est utilisé comme contrôle positif (B). L'inhibition de l'activité de la trypsine par WSCP est testée en ajoutant de la protéine à un ratio moléculaire de 1:1 (C) ou 1:10 (D).

2. C.2 La protéine WSCP n'inhibe pas les protéases à sérine par zymographie réverse

La zymographie réverse permet de visualiser dans un gel de polyacrylamide l'activité antiprotéase des protéines. Les échantillons protéiques sont séparés par gel SDS-PAGE contenant de la gélatine. Le détergent est éliminé après la migration afin de permettre aux protéines de se renaturer, puis les gels sont incubés en présence de protéases. Ces enzymes dégradent toutes les protéines à l'exception des inhibiteurs de la protéase étudiée et de la gélatine à proximité. Ces complexes sont révélés par une coloration au bleu de Coomassie.

Avant de réaliser les zymogrammes, nous avons réalisé une coloration au bleu de Coomassie après la séparation SDS-PAGE afin d'estimer la qualité et la bonne quantification des protéines à tester (Fig. 7 A). L'inhibiteur STI (Sigma Aldrich), d'un poids moléculaire de

18 kDa, ne présente pas de bande contaminante (Fig. 7 A, partie gauche) tout comme pour WSCP (Fig. 7 A, partie droite). Une forte inhibition de la trypsine par STI est visible dans la figure 7 B. Avec une concentration plus importante de STI (500 ng à 5 µg) l'inhibition s'étend largement autour de la bande STI. Cela est vraisemblablement dû à une diffusion de la protéine dans le gel. Par contre WSCP n'inhibe pas la trypsine dans les conditions testées car aucune coloration au bleu de Coomassie n'est observée quelque que soit la quantité de protéines déposées (Fig. 7 B, partie droite).

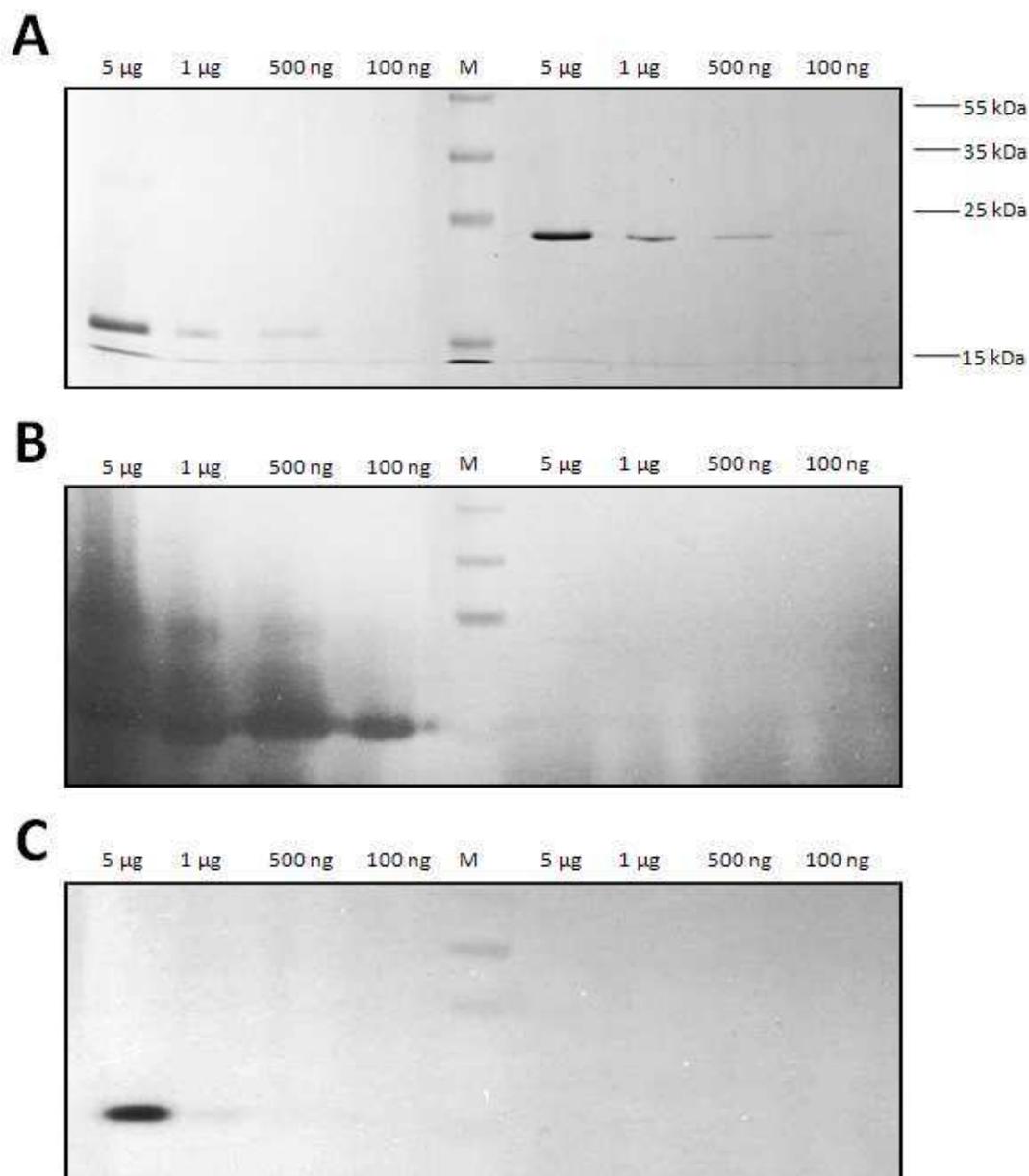


Figure 7 : Etude par zymographie réverse des propriétés d'inhibition des protéases à sérine par les protéines STI et WSCP

Des quantités décroissantes de protéines STI (*Soybean Trypsin Inhibitor* ; partie gauche) inhibitrice des protéases à sérines, ou WSCP (partie droite) sont séparées par gel SDS-PAGE. Les protéines sont ensuite renaturées dans le gel puis incubées en présence d'une protéase à sérine. Les sites d'inhibition de la protéase apparaissent lors de la coloration au bleu de coomassie (zymographie réverse). **A)** Coloration des gels (sans gélatine) au bleu de Coomassie. **B)** Zymographie réverse réalisée avec la trypsine. **C)** Zymographie réverse réalisée avec la chymotrypsine.

L'activité de la chymotrypsine est aussi inhibée par STI (Fig. 7 C) bien que moins efficacement que pour la trypsine. L'inhibition nécessite au moins 1 μg de STI pour être visible par zymographie réverse. Comme pour la trypsine, aucune inhibition de la chymotrypsine n'est observée pour WSCP.

Les protéines recombinantes WSCP n'ont donc aucune activité contre la trypsine et la chymotrypsine dans les conditions testées de zymographie réverse.

3 Expression de la protéine WSCP en condition normale de culture et en condition de stress

3. A Caractérisation d'un anticorps dirigé contre la protéine WSCP

Nous ne disposons pas d'anticorps dirigés contre la protéine WSCP d'*Arabidopsis thaliana* à mon arrivée dans le laboratoire. Nous avons donc décidé d'immuniser un lapin avec une protéine WSCP recombinante comprenant son peptide d'adressage. Les conditions d'expression de la protéine recombinante et la méthode de purification par colonne d'affinité sont les mêmes que celles énoncées précédemment en 2.A (Purification de la protéine présentée en Annexe 3).

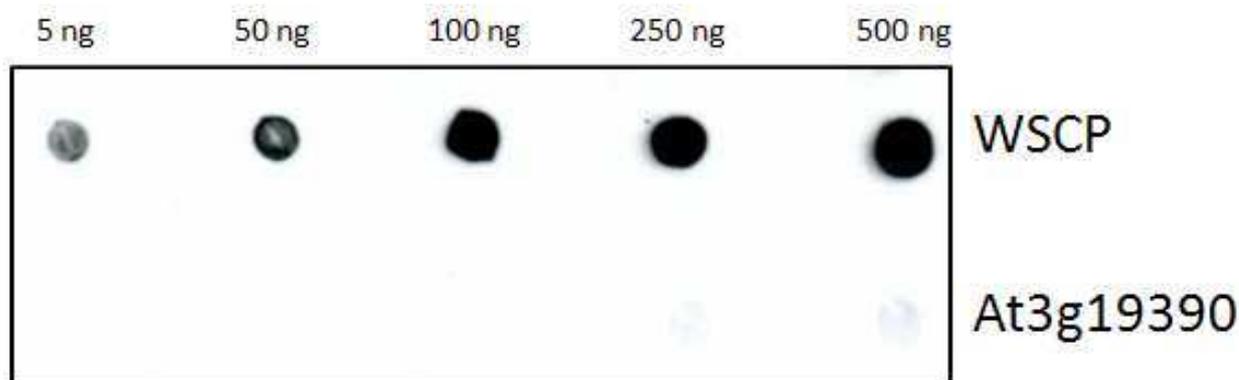


Figure 8 : Immunodétection de quantité croissante (5 à 500 ng) de protéine WSCP utilisées pour la production des anticorps et d'une cystéine protéase codée par le gène At3g19390 révélée par le sérum anti-WSCP (dilué au 1/5000).

Nous avons testé dans un premier temps la sensibilité des anticorps pour la protéine recombinante WSCP par Dot blot avec une protéase à cystéine recombinante étiquetée histidine comme contrôle négatif de spécificité (codée par le gène At1g19390). Un Dot blot a été préalablement réalisé en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine des

protéines recombinantes afin de s'assurer de la bonne quantification des dépôts sur membrane de nitrocellulose (résultat non montré).

L'anticorps dirigé contre notre protéine d'intérêt présente une bonne sensibilité. En effet, un signal de très forte intensité est obtenu pour une faible quantité de protéines déposées sur membrane (5 ng) et pour un temps d'exposition du film court (1 seconde ; fig. 8 partie supérieure).

3. B Expression de la protéine WSCP en conditions normales de croissance

Des protéines WSCP sont exprimées chez de nombreuses plantes de la famille de *Brassicaceae* dans les feuilles en condition normale de croissance, comme par exemple chez *Lepidium virginicum* (Murata *et al.* 1980), *Brassica oleracea* var. *gemmifera* DC (Kamimura *et al.* 1997) ou encore *Brassica oleracea* var. *Botrys* (Nishio et Satoh. 1997). Chez *Arabidopsis* en revanche, une étude bioinformatique réalisée suite à des expériences de *microarray* (Tung *et al.* 2005) et une approche par FDD (*Fluorescent Differential Display* ; Scutt *et al.* 2003) ont mis en évidence la présence du transcrit de WSCP uniquement dans les fleurs. Nous avons donc décidé de suivre par western blot la présence de WSCP dans les différents organes.

3. B.1 La protéine WSCP est exprimée dans les inflorescences en conditions normales de croissance

Une extraction des protéines totales de différents tissus a été réalisée afin de connaître le profil d'expression de WSCP en condition normale de culture (jours long, plantes en terre) par immunodétection. Les siliques ont été récoltées à trois stades de développement (Fig. 9 B) : après la chute des organes floraux (siliques 1), à maturation avant dessiccation (siliques 2) et en cours de déshydratation avant l'ouverture des valves et relargage des graines (siliques 3). La séparation des protéines par SDS-PAGE révèle un chargement plus faible en protéines pour le puits correspondant aux racines (Fig. 9 A). La protéine WSCP n'est détectée ni dans les feuilles ni dans les racines. Par contre, elle est fortement immunodétectée dans les inflorescences. Sa quantité diminue progressivement au cours de la maturation des siliques (Fig. 9 C). Il est important de noter qu'aucune protéine WSCP n'est immunodétectée dans les graines (Partie III). En effet, contrairement à WSCP, certaines protéines de la famille des

inhibiteurs de protéases à domaine Kunitz s'accumulent dans les graines en formation notamment chez les légumineuses (Olivia *et al.* 2010).

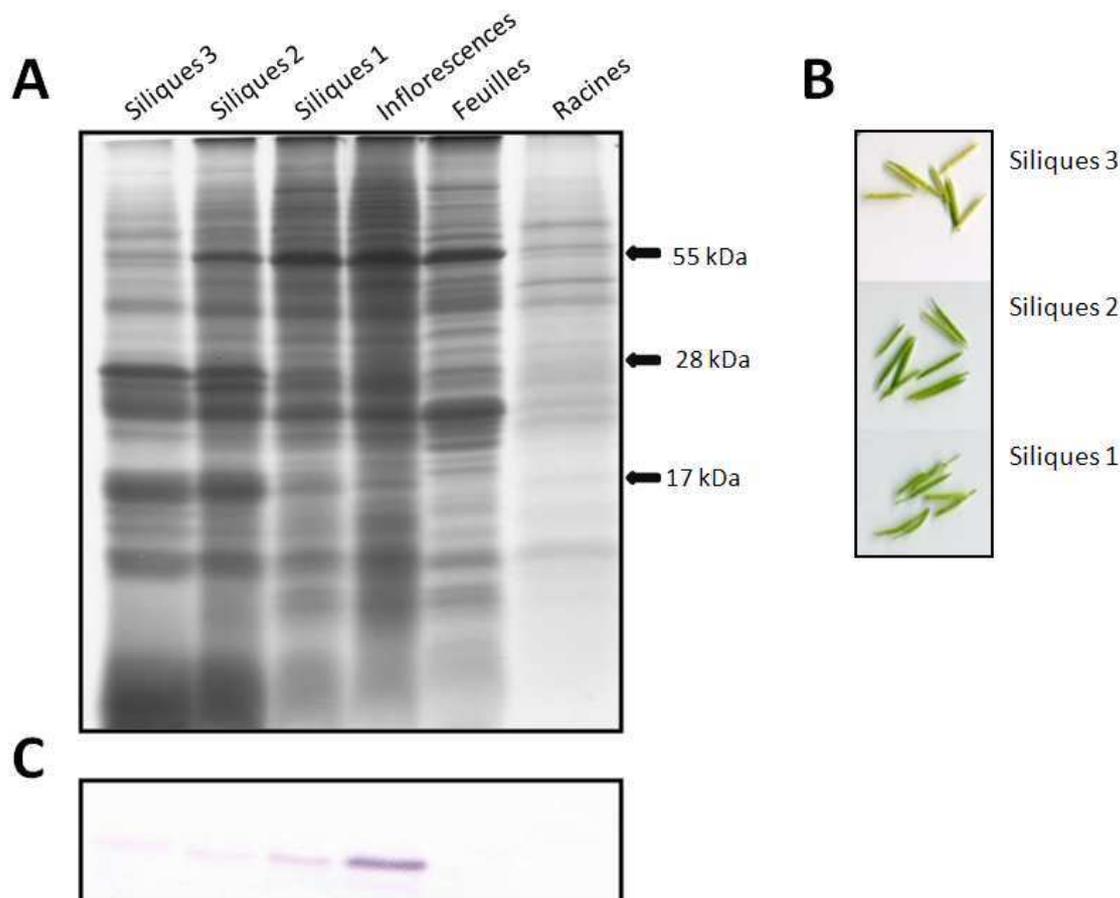


Figure 9 : Accumulation des protéines WSCP dans les différents organes de la plante adulte d'*A. thaliana* en jours longs.

30 μ g de protéines totales sont déposés par puits. A) SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des protéines des différents tissus. B) Photos des différents stades de siliques utilisées pour l'extraction de protéines. Siliques 1 : siliques après la chute des pétales et de sépales (Stade 16 selon Smith *et al.* 1990) ; Siliques 2 : siliques matures avant dessiccation (Stade 17) ; Siliques 3 : siliques en cours de déshydratation (Stade 18). C) Immunodétection de WSCP par le sérum anti-WSCP (1/5000).

3. B.3 La protéine WSCP est faiblement exprimée dans les plantules étiolées

Une étude réalisée au sein de notre laboratoire a montré l'expression à l'obscurité d'une protéine appartenant à la famille des WSCP chez l'orge (*Hordeum vulgare*), et à conclure que son rôle est le stockage transitoire des précurseurs de la chlorophylle lors du passage de l'obscurité à la lumière (Reinbothe *et al.* 2004). Par ailleurs chez *Arabidopsis*, une étude d'expression génétique réalisée par *microarray* sur des plantules étiolées a révélé une présence non négligeable du transcrit WSCP (Alonso *et al.* 2003 ; «*supplemental data*»). Nous avons donc analysé l'expression de WSCP dans les jeunes plantules ayant germé à la lumière ou à l'obscurité (Fig. 10).

Une immunodétection est réalisée sur des extraits protéiques de plantules ayant poussé 4 jours à l'obscurité ou à la lumière avec l'anticorps dirigé contre WSCP (Fig. 10 A et B). La protéine WSCP n'est immunodéTECTÉE que dans les plantules étiolées. Une approche plus détaillée de la localisation et de la fonction de WSCP sera abordée en détail dans le chapitre III du manuscrit.

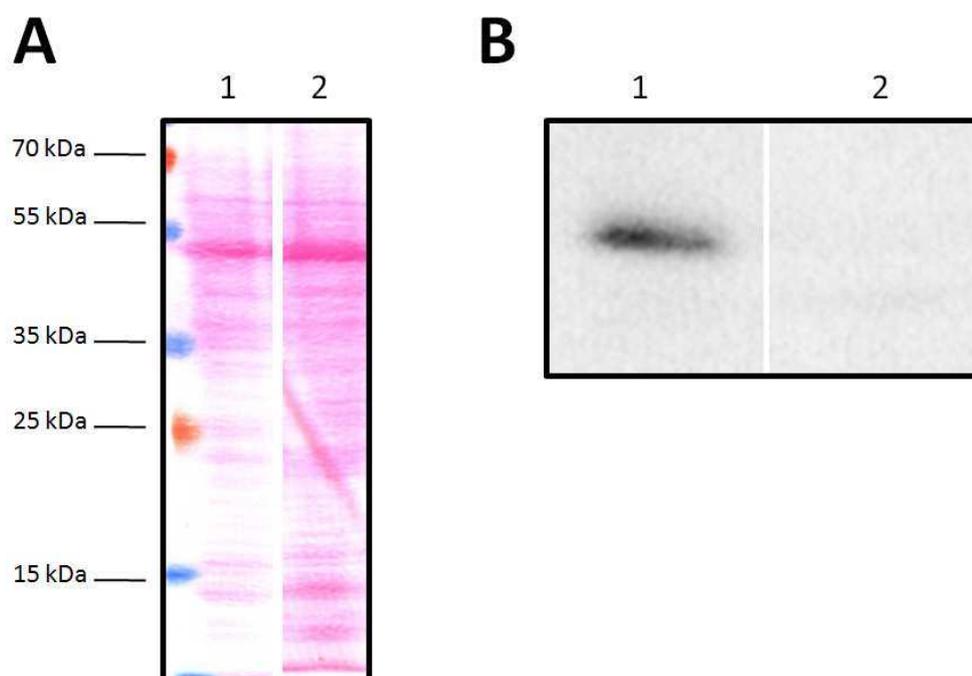


Figure 10 : Détection des protéines WSCP chez les plantules âgées de 4 jours ayant poussées à l'obscurité (1) ou en jour continu (2).

40 µg de protéines totales sont déposées par puits. A) Profil de protéines obtenu par coloration au rouge ponceau de la membrane après transfert. B) Immunodétection de WSCP par un anticorps dirigé contre la protéine.

3. C Etude de l'expression de WSCP en condition de déshydratation rapide et de stress salin

Les protéines de la famille des WSCP sont connues chez les *Brassicaceae* comme étant exprimées lors d'une grande variété de stress abiotiques (voir Satoh *et al.* 2001 pour revue). Nous nous sommes intéressés au stress salin et au stress engendré par la déshydratation décrit comme induisant fortement WSCP chez le colza (*Brassica napus* ; Reviron *et al.* 1992) et le radis (*Raphanus sativus* ; Lopez *et al.* 1994). En effet, lors de ces stress le profil d'expression des WSCP est visible simplement par une coloration au nitrate d'argent des protéines séparée sur gels SDS-PAGE. Nous avons testé ces deux stress dans le but de savoir si, comme chez de nombreuses *Brassicaceae*, WSCP est une protéine induite en condition de stress dans la plante *Arabidopsis thaliana*.

Stress de déshydratation rapide

Le profil d'expression de WSCP d'*Arabidopsis* a été étudié en condition de déshydratation rapide en adaptant le protocole publié par Downing *et al.* en 1992. Les plantes cultivées en terre pendant deux semaines sont retirées du substrat et posées sur un papier absorbant pendant 0, 1, 3 ou 7 h 30. Les protéines sont ensuite extraites, séparées sur gel SDS-PAGE et des immunodétections sont entreprises avec des anticorps dirigés contre WSCP, CSD2 (*Cu/Zn Superoxide Dismutase 2*) et RD21 (*Responsive to Dehydration 21*; Koizumi *et al.* 1993).

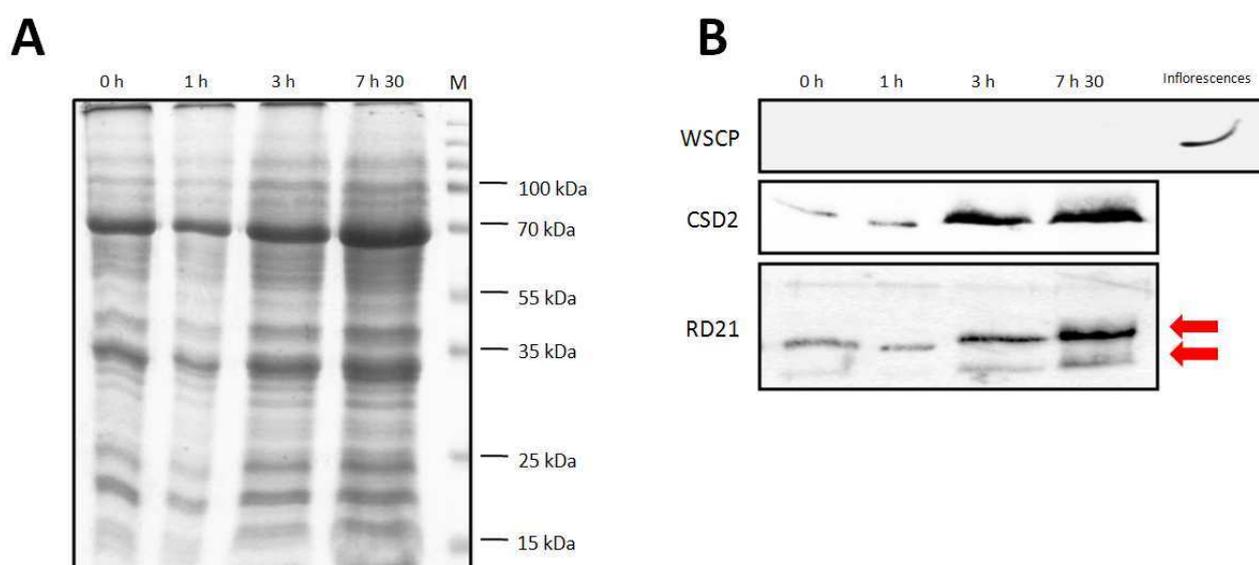


Figure 11 : Profil d'expression des protéines WSCP lors d'un stress déshydratation rapide.

Des plantes âgées de deux semaines sont retirées du sol et déposées sur un papier absorbant pour une durée de 0 à 7 h 30, les protéines sont ensuite extraites. A) SDS-PAGE et coloration des protéines au bleu de Coomassie. M : marqueur de poids moléculaire. B) Immunodétection des protéines WSCP, CSD2 et RD21. Le dépôt supplémentaire d'extraits protéiques d'inflorescence est un contrôle positif pour l'immunodétection de WSCP. Les protéines CSD2 et RD21 sont décrites pour être induite en condition de stress. Les flèches rouges représentent les isoformes immatures et matures de RD21.

Sur le gel coloré au bleu de Coomassie de la figure 11 A, les profils protéiques avant et après le stress sont très similaires. Une légère accumulation de polypeptides de poids moléculaires compris entre 15 kDa et 25 kDa semble toutefois survenir au cours du traitement. Par immunodétection, nous montrons que WSCP ne s'accumule pas dans les feuilles lors du stress déshydratation (Fig. 11 B). Comme contrôle interne du bon fonctionnement de l'expérience, nous avons utilisé deux anticorps dirigés contre les protéines de stress CSD2 et RD21. Le cDNA codant pour RD21 a été isolé pour la première fois lors d'un stress du même type (Koizumi *et al.* 1993). Et CSD2 est une enzyme qui s'accumule lors de stress oxydatifs et déshydratation (Sunkar *et al.* 2006; França *et al.* 2007). Les

immunodétections des protéines CSD2 et RD21 montrent une accumulation progressive de ces protéines dans les feuilles à partir de la troisième heure de stress hydrique (Fig. 11 B ; les flèches rouges représentent les formes intermédiaires (38 kDa) et matures (33kDa) de RD21 selon Yamada *et al.* 2001).

Stress salin

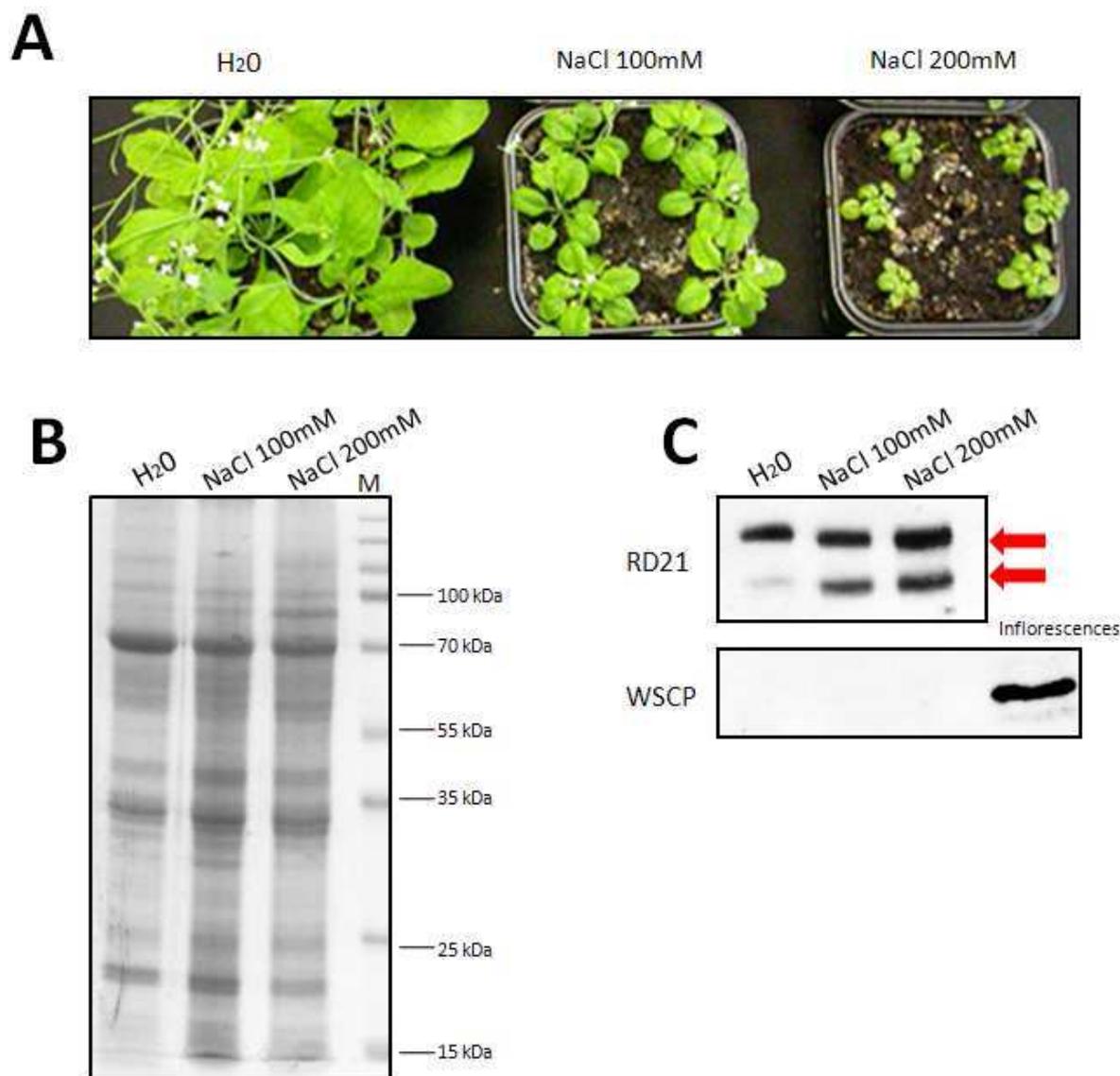


Figure 12 : Profil d'expression des protéines WSCP lors d'un stress salin.

Des plantes âgées de deux semaines sont arrosées tous les trois jours pendant deux semaines avec de l'eau ou une solution de NaCl à une concentration de 100 mM ou 200 mM. Les plantes sont photographiées et les protéines extraites. A) Phénotype des plantes après deux semaines de traitement. B) SDS-PAGES et coloration des protéines au bleu de Coomassie. M : marqueur de poids moléculaire. C) Immunodétection des protéines WSCP et RD21 par l'utilisation de leur anticorps respectif. Le dépôt supplémentaire est un contrôle positif pour l'immunodétection de WSCP. RD21 est décrite dans la littérature pour être induite en condition de stress salin. Les flèches rouges représentent les isoformes immatures et matures de RD21.

Des plantes de 2 semaines sont soumises pendant la même période à un arrosage tous les trois jours avec de l'eau ou une solution de NaCl à une concentration de 100 mM ou 200 mM. Après le traitement, un retard de croissance très net est observé chez les plantes arrosées avec les solutions salées. Plus la concentration en sel est importante, plus le développement des feuilles de rosette et le début de la floraison sont retardés (Fig. 12 A). Les feuilles présentent également un début de sénescence à leurs extrémités pour la plus forte concentration en sel.

Suite aux traitements, les protéines sont extraites, séparées par gel SDS-PAGE (Fig. 12 B) et les protéines WSCP et RD21 immunodétectées avec leurs anticorps respectifs. Une nouvelle fois, aucune protéine WSCP n'est immunodétectée avec les conditions d'expérience (Fig. 12 C). RD21 est encore utilisée comme contrôle interne positif de l'expérience car le transcrite est connu pour s'accumuler lors d'un stress salin (Seki *et al.* 2002). Une accumulation de la protéine est observée lors des stress salins. L'isoforme correspondant à la forme mature de 33 kDa augmente cependant plus que l'isoforme immature en fonction de la concentration en NaCl (Fig. 12 C). Contrairement aux observations faites chez d'autres *Brassicaceae*, la protéine WSCP d'*Arabidopsis* n'est pas induite lors deux conditions testées.

CHAPITRE II

Implication de WSCP dans le contrôle de la mort cellulaire au cours du développement floral

Dans le chapitre I, nous avons pu observer une expression atypique de WSCP d'*Arabidopsis thaliana* pour une protéine appartenant famille. En effet, cette dernière s'accumule uniquement dans les inflorescences et les plantules étiolées. Aucune induction n'est observée en conditions de stress salin et hydrique. Nous avons souhaité pousser l'investigation de la fonction de la protéine WSCP dans la fleur en examinant précisément son expression en fonction du développement. Puis, par une approche de génétique inverse basée sur l'étude d'un mutant nul pour *WSCP*, nous avons étudié les conséquences du déficit de la protéine correspondante sur divers processus liés au développement ou au fonctionnement de l'appareil reproductif.

1 Description du mutant *wscp-Salk* (Salk_009681)

1. A Caractéristique de l'insertion de l'ADN-T chez le mutant *wscp-Salk*

La lignée mutante Salk_009691 (nommée ensuite *wscp-Salk*) est issue de la collection de mutants d'insertion du *Salk Institute* (La Jolla, USA) ; il s'agissait de la seule lignée mutante disponible pour le gène *WSCP*. Avant mon arrivée au laboratoire, un premier rétrocroisement avait été réalisé mais aucune analyse particulière n'avait été menée. Mon but a été dans un premier temps de caractériser ce mutant d'insertion.

Le gène *WSCP* (At1g72290) contient un exon unique de 648 pb (Fig. 13 A). Le *Salk Institute* a déterminé le site de l'insertion par séquençage en utilisant une amorce située dans la bordure gauche de l'ADN-T (*Left Border* ; Alonso *et al.* 2001). D'après cette analyse, l'ADN-T est inséré chez le mutant *wscp-Salk* dans l'unique exon à proximité de l'extrémité 3' entre la 601^{ième} et la 602^{ième} pb. La présence de l'ADN-T dans l'unique exon a été suivie au cours des générations *via* le génotypage par PCR, en utilisant deux couples d'amorces : F/R pour l'allèle sauvage et GT2/R pour l'allèle mutant. Les amplicons sont d'environ 1150 pb et 1000 pb respectivement conformément à la position du site déterminée par le *Salk Institute* chez *wscp-Salk* (respectivement 1151 pb et 1008 pb ; Fig. 13 B).

Trois rétrocroisements (ou *backcross*) ont été réalisés et 17 plantes *wscp-Salk* homozygotes ont été analysées par southern blot afin de déterminer le nombre d'insertion d'ADN-T. Il est important de déterminer leur nombre car environ 50 % des plantes de la collection du *Salk Institute* ont au moins une autre insertion dans leur génome

(http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html). Ces ADN-T surnuméraires peuvent provoquer des phénotypes parasites.

L'enzyme de restriction *EcoRI* a été employée pour digérer l'ADN génomique et la sonde utilisée pour déterminer le nombre d'insertion correspond à la séquence codante NPTII (résistance à la kanamycine). L'échantillon correspondant à la plante sauvage montre un profil de southern blot vierge (Fig. 13 C). Toutes les plantes *wscp-Salk* homozygotes pour l'insertion présentent quatre bandes d'intensités différentes. Nous pouvons en conclure qu'il y a au minimum une insertion d'ADN-T en plus dans le mutant *wscp-Salk*.

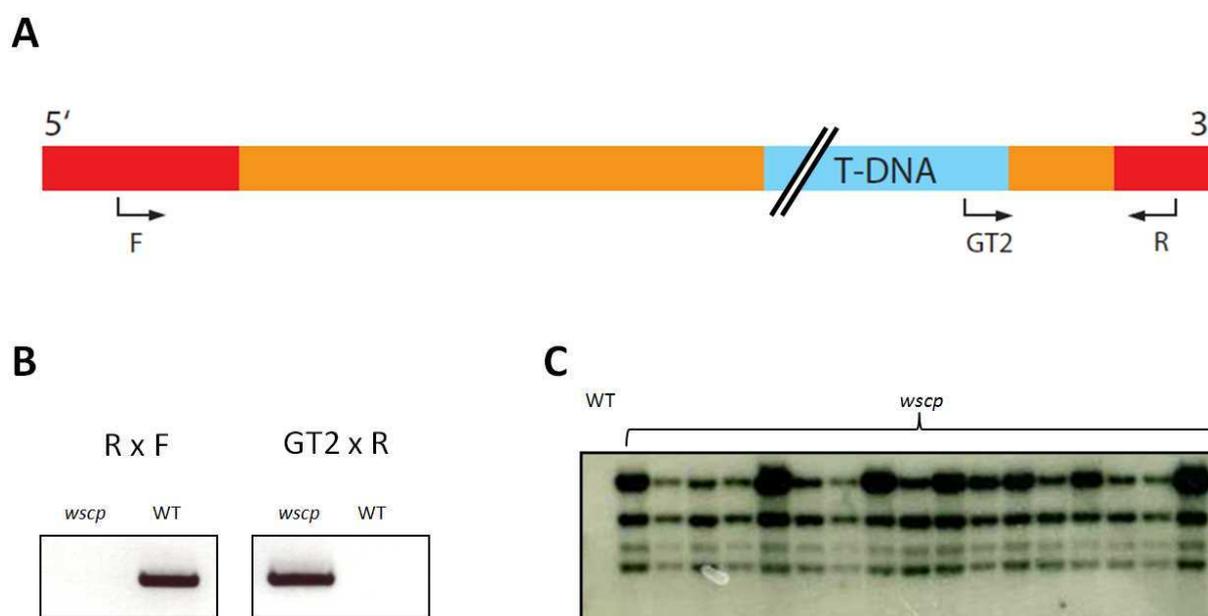


Figure 13 : Description de la lignée *wscp-Salk* (Salk_009681)

(A) Représentation de gène *WSCP* (At1g72290) et de l'insertion de l'ADN-T chez le mutant *wscp-Salk*. Le gène *WSCP* est codé par un exon unique (en orange) où l'ADN-T est inséré au niveau de l'extrémité 3' (en bleu) chez le mutant *wscp-Salk*. Les régions 5' et 3' UTR sont représentées en rouge et les couples d'amorces utilisés pour le génotypage par PCR, sont symbolisés par des flèches.

(B) Confirmation de l'insertion de l'ADN-T dans la lignée *wscp-Salk* par PCR. Le couples d'amorces F/R permet d'amplifier l'allèle sauvage et le couple d'amorce GT2/R, l'allèle mutant.

(C) Détermination par southern blot du nombre d'insertion ADN-T dans la lignée *wscp-Salk* après 3 backcross. 10 µg d'ADN génomique du sauvage (WT) ou des mutants *wscp-Salk* homozygotes ont été digérés par l'enzyme *EcoRI*. Après migration des fragments sur gel d'agarose et transfert, la membrane est hybridée avec la sonde radiomarquée correspondant au gène de résistance à la kanamycine.

1. B Le mutant *wscp-Salk* n'exprime pas la protéine WSCP

L'insertion d'un ADN-T dans une région codante n'est pas toujours associée à une absence d'expression de la protéine. En effet, nous avons observé au sein de notre laboratoire que chez d'autres mutants d'insertion de la même collection (*Salk Institute*), des profils d'expression pouvaient varier de la sous-expression à la surexpression de la protéine. Il est donc important de quantifier le niveau d'expression de WSCP chez le mutant *wscp-Salk*.

Dans le chapitre 1, nous avons trouvé une expression importante de WSCP dans les inflorescences des plantes sauvages par western blot (Fig. 9 C). Nous avons souhaité tester la présence de WSCP chez le mutant *wscp-Salk* de la même manière. Les résultats sont présentés dans la figure 14. L'immunodétection réalisée avec les anticorps dirigés contre WSCP donne trois bandes chez le sauvage par western blot. Une bande de forte intensité à 21 kDa qui correspond à la taille attendue pour la protéine WSCP et deux bandes à 55 kDa et 13 kDa qui sont considérées comme aspécifiques, car ils sont retrouvés également chez le mutant *wscp-Salk*. Par contre, aucune protéine correspondant à WSCP n'est immunodétectée. Nous pouvons en conclure que le mutant *wscp-Salk* est donc un mutant nul.

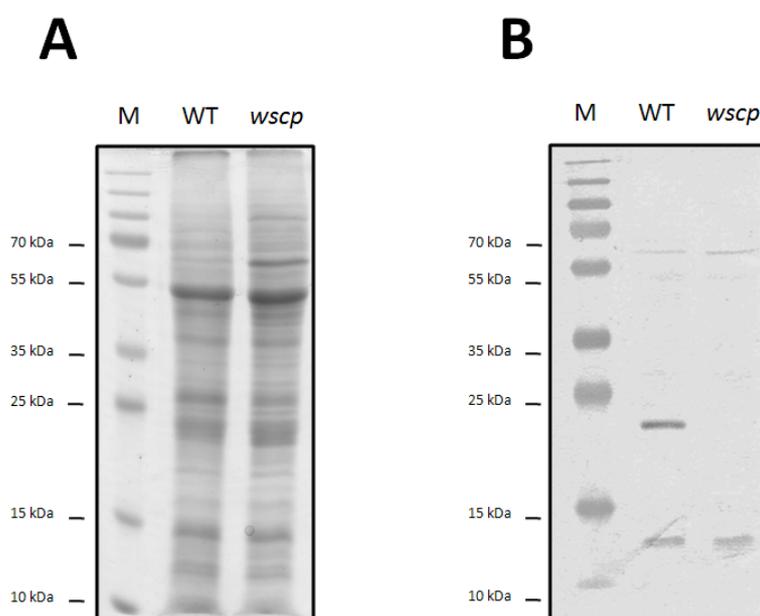


Figure 14 : Immunodétection par western blot des protéines WSCP chez le mutant *wscp-Salk*.

30 µg de protéines totale d'inflorescences du sauvage (WT) ou du mutant *wscp-Salk* (*wscp*) sont déposés par puits. A) SDS-Page et coloration au bleu de Coomassie des protéines. B) Immunodétection de WSCP par un anticorps dirigé contre la protéine. M : marqueur de poids moléculaire.

1. C Le mutant *wscp-Salk* se développe normalement en conditions standards de culture

Les plantes sauvages et mutantes *wscp-Salk* ont été cultivées en terre en jours longs. Les plantes mutantes sont capables de se développer de manière autotrophe à une vitesse comparable aux plantes sauvages (Fig. 15).

Cette absence de phénotype évident est en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre I. En effet, les analyses par western blot du profil d'expression de WSCP ont montré une présence de la protéine uniquement dans les fleurs, les jeunes siliques et aucune

expression dans les autres tissus (Fig. 9 C). Les parties traitées ultérieurement vont se focaliser sur le rôle de la protéine WSCP lors du développement floral.

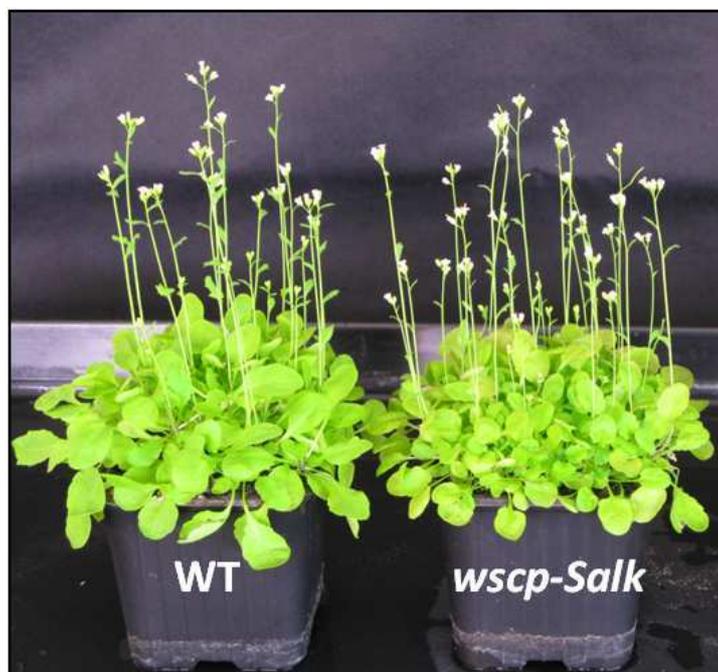


Figure 15 : Phénotype du mutant *wscp-Salk* en condition normale de culture
Les plantes sont cultivées en jours longs pendant 5 semaines

1. D Présentation des lignées *wscp-Salk* surexprimant WSCP

Les résultats de southern blot ont montré la présence d'ADN-T surnuméraires. Une complémentation fonctionnelle du mutant *wscp-Salk* est nécessaire dans le but de restaurer le phénotype sauvage et ainsi s'assurer de la spécificité des phénotypes observés.

Le mutant *wscp-Salk* a été complétement avec la séquence codante complète du gène *WSCP* sous contrôle du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, *via Agrobacterium tumefaciens* (cf. Matériel et méthodes). La descendance de ces plantes, appelée population T1, a été semée en terre puis les transformants ont été sélectionnés par résistance à l'herbicide BASTA[®]. Les plantes résistantes de la génération T1 sont repiquées en terre et leurs descendance soumise à un nouveau traitement à l'herbicide. Les plantes T2 résistantes sont en théorie soit homozygotes, soit hétérozygotes pour la construction (car les plantes T1 sont normalement toutes hétérozygotes pour la construction et les plantes sauvages en T2 sont éliminées par le traitement). Après semis des populations T3, on travaille uniquement les plantes 100 % résistantes donc homozygotes pour l'insertion.

Une extraction de protéine de feuilles des différentes lignées complémentées nous a permis de vérifier par western blot l'expression de WSCP (Fig. 16 A et B). Les mutants complémentés ont des niveaux de protéines immunodétectées qui diffèrent beaucoup d'une population à l'autre. Ainsi lignée n°5 présente une importante expression de WSCP dans les feuilles à un niveau presque équivalent à celui détecté dans les inflorescences des plantes sauvages. Une faible quantité de protéines WSCP est immunodétectée dans la lignée n°10. Nous étudierons par la suite les lignées n°2, 5 et 10.

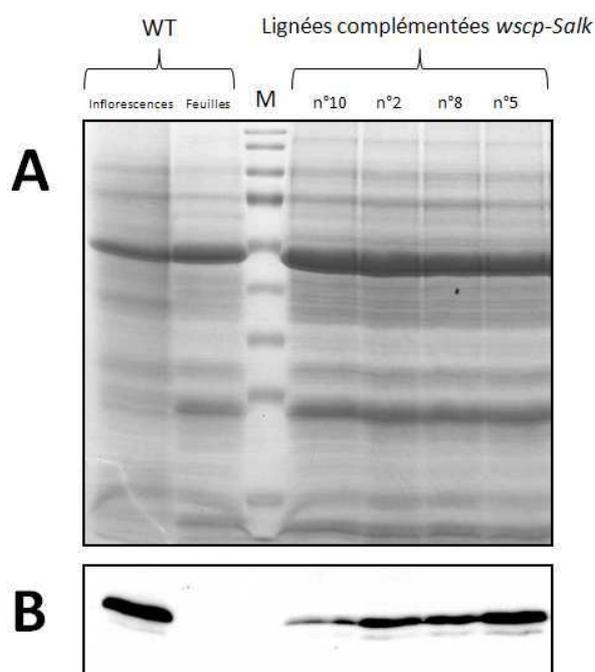


Figure 16 : Profil d'expression de la protéine WSCP chez la génération T3 des lignées *wscp-Salk* complémentées.

60 μ g de protéines totales du sauvage (WT) ou de feuilles des lignées indépendantes T3 *wscp-Salk 35S::WSCP* sont déposés par puits. A) SDS-PAGE et coloration des protéines au bleu de Coomassie. M : marqueur de poids moléculaire. B) Immunodétection de WSCP par un anticorps dirigé contre la protéine.

2 WSCP est localisée dans le septum et dans le style des fleurs

2. A L'expression du promoteur *WSCP* est localisée dans le septum et le funicule des fleurs

Afin d'étudier la localisation tissulaire de l'expression du gène *WSCP*, nous avons réalisé une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de ce gène et le gène rapporteur GUS (β -Glucoronidase). Le promoteur amplifié par PCR a été cloné avec la méthode GATEWAY dans le vecteur pHGFS7 (cf. matériels et méthodes) en amont du gène GUS. Cette

construction a servi à transformer de façon stable des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. Les résultats montrés en figure 17 sont issus de l'observation de 5 lignées indépendantes.

En conditions normales de culture, l'expression GUS est présente uniquement dans les inflorescences au niveau des pistils (Fig. 17 A). Le profil d'expression GUS est en accord avec les résultats précédemment obtenus par western blot (Fig. 9 C). Cependant, l'expression n'est pas uniforme dans tous les pistils. Celle-ci est absente dans les stades précoces (fleurs au centre de l'inflorescence) et pratiquement absente dans les fruits en maturation à l'exception d'un léger marquage au niveau du stigmate.

Dans les pistils avant fécondation (Fig. 17 B), le profil d'expression GUS est localisé dans le tissu de transmission du septum et du style.

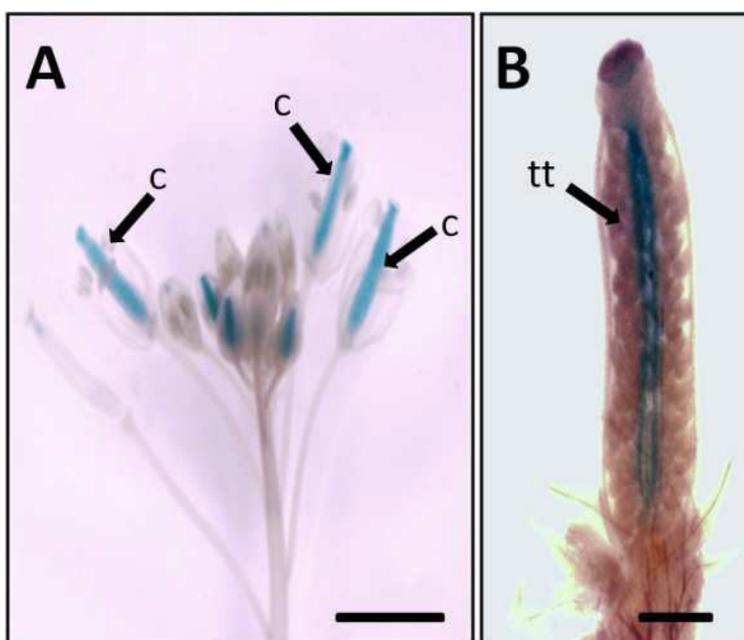


Figure 17 : Analyse de l'expression du promoteur du gène WSCP dans les inflorescences.

Des inflorescences de plantes âgées de 3 semaines sont colorées et les différentes parties du stigmate analysées. A) Inflorescence. Barre d'échelle : 5 mm. B) Pistil d'une fleur avant anthèse. c : carpelle ; tt : tissu de transmission. Barre d'échelle : 5 mm pour A et 300 μ m pour B.

2. B WSCP est présente dans le tissu de transmission du style

Le pistil d'*Arabidopsis* est un organe complexe. Nous avons opté pour la technique d'immunolocalisation afin d'étudier avec précision l'expression de la protéine WSCP dans ces structures au cours du développement floral.

Des fleurs à différents stades de développement sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μ m sont réalisées avec un microtome (gracieusement prêté par l'équipe

de Michel Herzog ex-PDC). Les coupes peuvent être utilisées pour l'immunolocalisation. Les étapes de cette expérience sont quasiment identiques à celles réalisées lors d'un western blot (cf. matériel et méthode). Cela dit, la révélation se fait ici avec un anticorps secondaire qui forme en présence de son substrat un précipité insoluble violet. Cette couleur traduit la présence de la protéine WSCP dans le tissu.

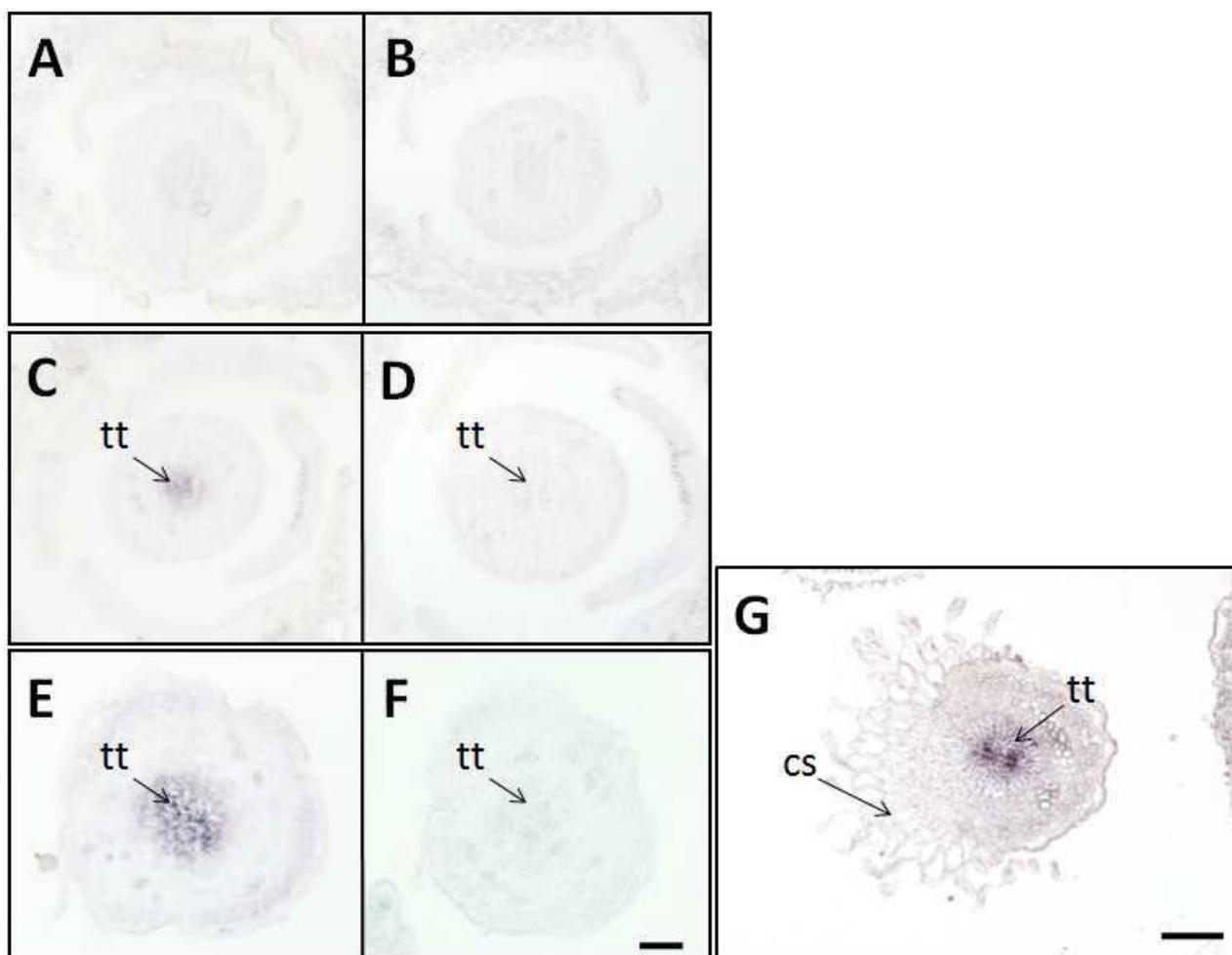


Figure 18 : Immunolocalisation de la protéine WSCP dans le style.

Les fleurs sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μm du style sont réalisées. Les coupes sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine WSCP (A, C, E, G) ou du sérum préimmun (B, D et F). Trois stades sont étudiés : 10-11 (A et B) ; 12 (C, D et G) et 14-15 (D et E). tt : tissu de transmission ; cs : cellules du stigmate. Barre d'échelle : 50 μm .

Dans la figure 18, la protéine WSCP s'accumule dans le tissu de transmission du style avant l'anthèse (stade 12 ; C) et atteint son niveau d'expression maximal après la fécondation (Stade 14 ; E). Aucun signal n'est observé avec le sérum préimmun utilisé comme anticorps primaire (Fig. 18 B, D, F). Il est également à noter qu'aucun signal n'a été observé dans les cellules allongées du stigmate (Fig. 18 G). Ces résultats corroborent les observations faites lors de l'étude du promoteur du gène *WSCP*.

2. D WSCP est exprimée dans le tissu de transmission et dans les cellules de l'épiderme du septum

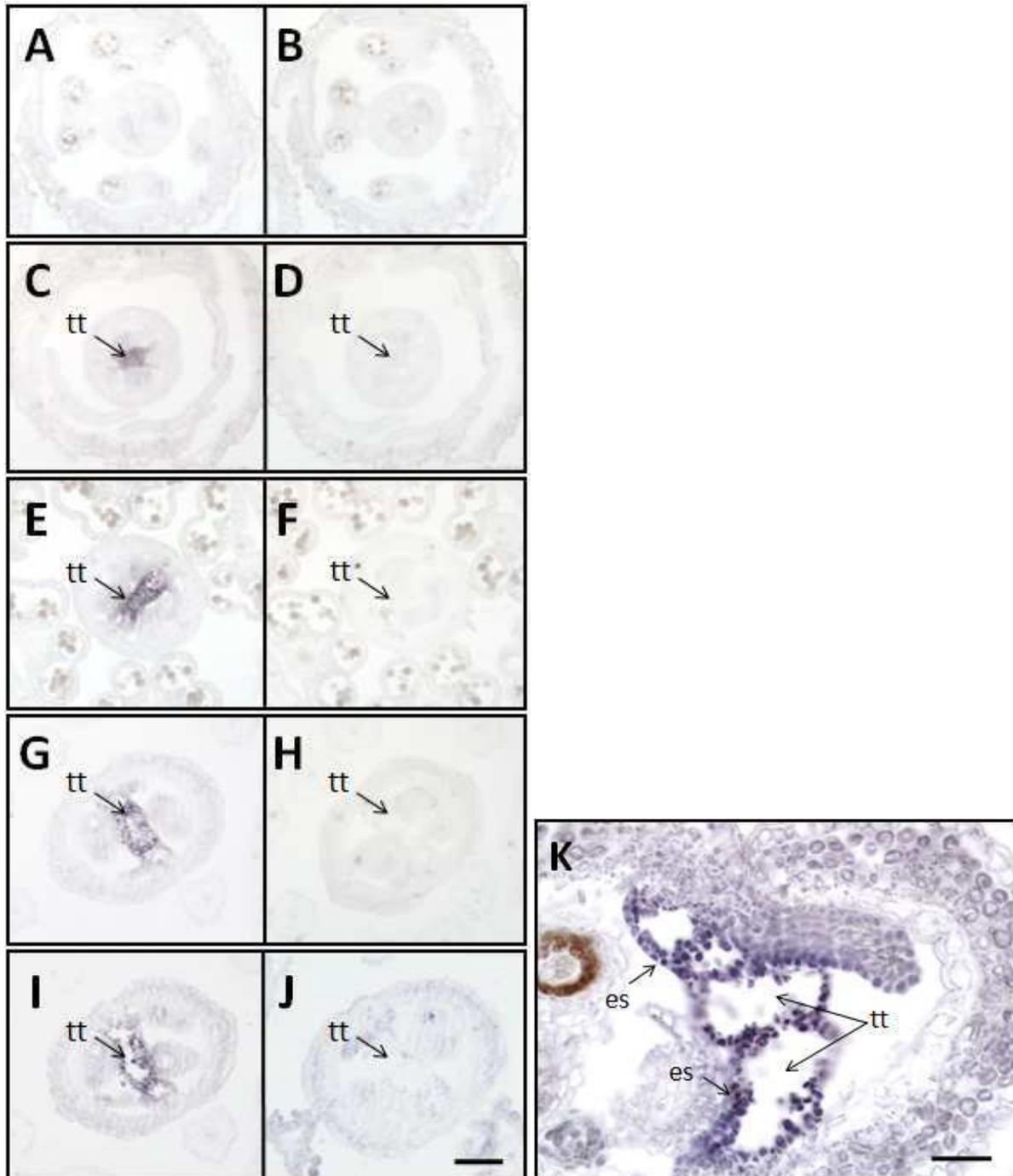


Figure 19 : Immunolocalisation de la protéine WSCP dans le septum.

Les fleurs sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μm du style sont réalisées. Les coupes sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine WSCP (A, C, E, G, I et L) ou du sérum préimmun (B, D, F, H et K). Cinq stades sont étudiés : 10 (A et B) ; 11 (C et D) ; 12 (E et F) ; 13 (G et H) ; 14 (I et J) ; >14 (K). tt : tissu de transmission ; es : épiderme du septum. Barre d'échelle : 50 μm pour A-K et 25 μm pour L.

Nous nous sommes intéressés cette fois-ci à l'expression de WSCP dans l'ovaire en utilisant à nouveau la technique d'immunolocalisation.

La protéine WSCP est immunodétectée à partir du stade 11 dans le tissu de transmission du septum (Fig. 19 C). La protéine s'accumule dans ce tissu jusqu'au stade 12 où son niveau est ensuite relativement constant jusqu'à des stades avancés du développement floral (Fig. 19 E-K). Le signal détecté est spécifique car aucun signal n'est observé avec le sérum préimmun utilisé comme anticorps primaire (Fig. 19, partie droite). WSCP est également très nettement immunodétectée dans l'épiderme du septum à partir du stade 12 jusqu'aux stades supérieurs à 14 (Fig. 19 K). Par ailleurs, les signaux sont toujours visibles au niveau des cellules lors des immunodétections et aucun signal n'est observé dans la matrice extracellulaire du tissu de transmission.

3 L'expression de la protéine WSCP est régulée par les facteurs de transcription NTT et HECATE

Depuis plusieurs années, de nombreux laboratoires s'appliquent à caractériser des facteurs de transcription impliqués dans l'identité et l'organisation des différents tissus floraux (Sablowski. 2009). Récemment, deux types de facteurs de transcription ont été identifiés comme étant spécifiques des tissus où progressent les tubes polliniques à savoir le style, le tissu de transmission, l'épiderme du septum et le funicule. On retrouve tout d'abord le facteur de transcription en doigt de zinc NTT, de la famille C2H2/C2H2, impliqué dans la formation du tissu de transmission. Le transcrite codant pour NTT est également détecté dans les funicules (Crawford *et al.* 2007). La seconde famille décrite rassemble les gènes *HEC* qui codent pour des facteurs de transcription de type bHLH ayant des fonctions redondantes au cours du développement floral (Gremski *et al.* 2007). *HEC1*, *HEC2* et *HEC3* sont exprimés dans le tissu de transmission, l'épiderme du septum et également dans le funicule. Nous nous sommes demandé si ces facteurs de transcription particuliers ne réguleraient pas l'expression de WSCP. En effet, les transcrits de *NTT* et des *HEC* ont une localisation similaire en hybridation *in situ* avec la protéine WSCP.

Pour tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps révélé la présence de WSCP par western blot dans des extraits protéiques d'inflorescences mutantes pour les gènes *NTT* ou *HEC1* ou le double mutant pour *HEC1* et *HEC3* (Fig. 20 A). La quantité de protéines

immunodétectées est très fortement diminuée chez le mutant *ntt* par rapport au sauvage. Une bande de faible intensité est toutefois visible. Ce résultat est en accord avec les données communiquées par Brian Crawford. En effet, il a réalisé des expériences de *microarray* sur le mutant *ntt* qui permettent d'étudier simultanément le profil d'expression de tous les transcrits en même temps. Ces expériences ont montré une régulation négative significative des transcrits du gène *WSCP* chez le mutant *ntt* par rapport aux plantes sauvages.

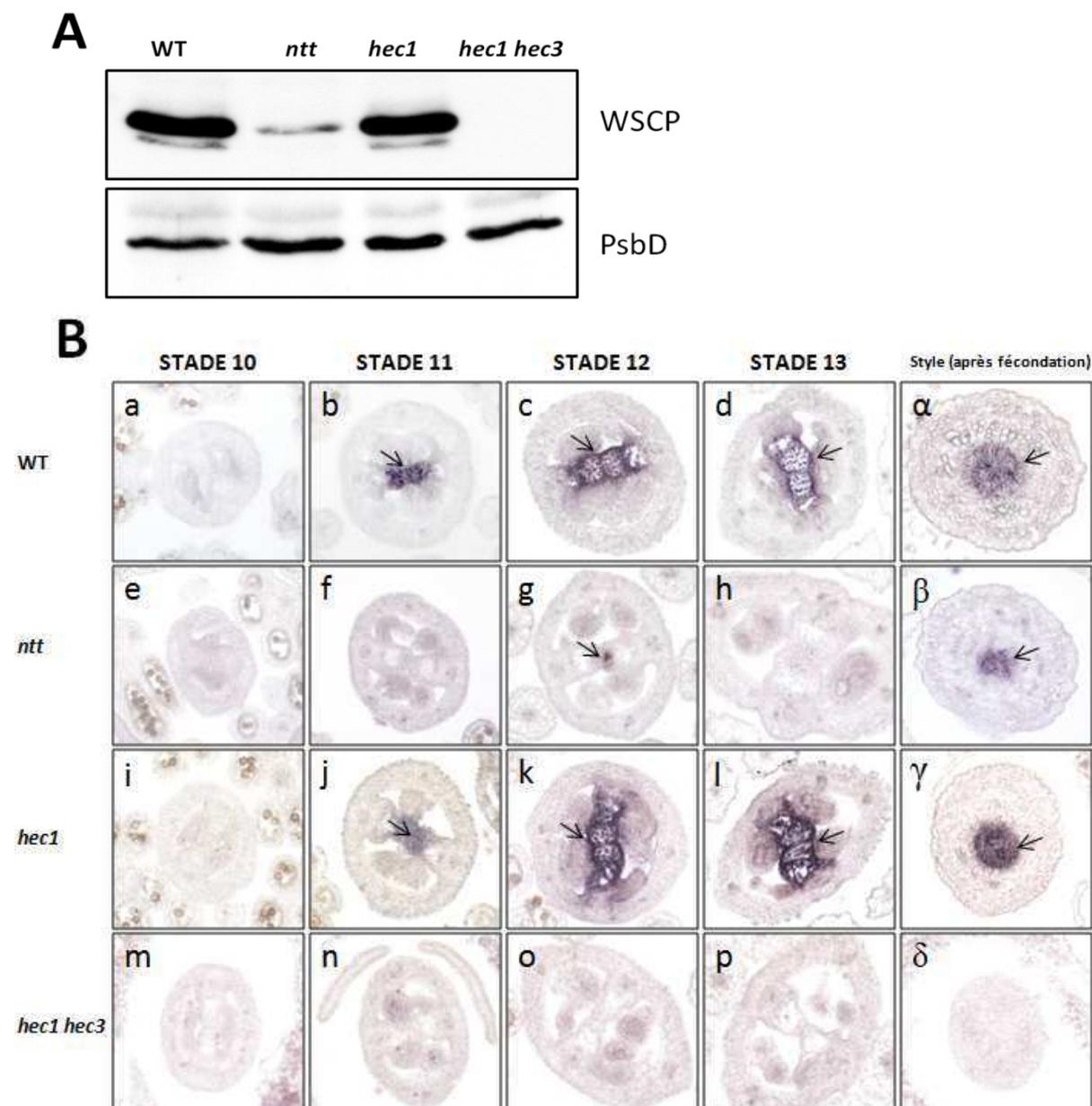


Figure 20 : Immunodétection de la protéine WSCP chez les mutants d'*A. thaliana* pour les facteurs de transcription NTT et HECATE.

A) Immunodétection par Western blot de la protéine WSCP et PsbD chez les mutant *ntt* (Crawford *et al.* 2007), *hec1*, et le double mutant *hec1 hec3* (Gremski *et al.* 2007). 30 µg de protéines totales d'inflorescences du sauvage (WT) ou des différents mutants sont déposés par puits et séparées sur gel SDS-PAGE. La protéine PsbD est utilisée comme contrôle de charge.

B) Immunolocalisation de la protéine WSCP dans le septum et le style des mutants pour les facteurs de transcription NTT et HECATE. Les fleurs du WT (a-d, α), *ntt* (e-f, β), *hec1* (i-l, γ) et *hec1 hec3* (m-p, δ) sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 µm du septum et du style sont réalisées. Cinq stades sont étudiés : 10 (a, e, i, m) ; 11 (b, f, j, n) ; 12 (c, g, k, o) ; 13 (d, h, l, p) ; style après fécondation (α, β, γ, δ).

Le mutant *hec1* présente en western blot une accumulation de la protéine WSCP très proche de celle obtenue chez les plantes sauvages. En revanche, chez le double mutant pour les facteurs de transcription HEC1 et HEC3 aucune protéine WSCP n'est immunodétectée. WSCP semble donc être régulée de manière directe ou indirecte par les facteurs de transcription NTT et HEC3 dans le pistil (Fig. 20 A). HEC1 pourrait également être impliquée si les facteurs de transcription de cette famille ont des fonctions redondantes. Nous ne disposons pas au sein de notre laboratoire du mutant nul *hec3* pour étayer plus en détail du rôle respectif de HEC1 et HEC3 dans la régulation de WSCP dans les inflorescences.

Nous avons ensuite réalisé une série d'immunolocalisation de WSCP sur les inflorescences des mutant *ntt*, *hec1* et *hec1 hec3* en fonction du développement floral (Fig. 20 B). Les plantes sauvages sont utilisées pour les comparaisons avec les différents mutants. Chez le mutant *ntt*, WSCP est détectée uniquement au stade 12 dans seulement quelques cellules du tissu de transmission et dans le style (e-h et β). Aucun signal n'est observé dans l'épiderme du septum chez ce mutant. Comme nous l'avons vu précédemment, WSCP s'accumule chez les plantes sauvages dans le septum à partir du stade 11. De plus, elle est présente dans les stades beaucoup plus tardifs du développement floral (a-d) contrairement au mutant *ntt*. L'accumulation de WSCP chez mutant *hec1* et chez les plantes sauvages est quasiment identique notamment au sein du septum et du style. En effet, la protéine WSCP est présente dans le septum des stades 11 à 13 (i-l) et dans le des styles après fécondation (γ). Cependant, quelques différences sont observables. La protéine WSCP est notamment détectée dans le funicule et dans une couche de cellules du replum située à proximité du tissu de transmission au stade 12 et 13 (k et l) mais elle n'est pas immunodétectée dans les fleurs du mutant *hec1 hec3* quelque soit le stade étudié (m-p et δ).

4 WSCP est impliquée dans la régulation de la mort cellulaire dans le tissu de transmission et dans l'épiderme du septum

Les fleurs de Lilas ont un style ouvert où les tubes polliniques ont une relative liberté de mouvements. En comparaison avec le style fermé d'*Arabidopsis*, une mort cellulaire et une dégénérescence des cellules du tissu de transmission sont nécessaires pour faciliter la progression des tubes polliniques dans le *gynoecium*. Toutefois cette mort cellulaire est

confinée au tissu de transmission et ne se produit pas dans les cellules de l'épiderme du septum (Crawford *et al.* 2007 ; Crawford et Yanofsky. 2008).

Les cellules du tissu de transmission sécrètent la matrice extracellulaire contenant notamment des polysaccharides acides et des protéines à arabinogalactanes (AGPs ; Lennon *et al.* 1998). De manière intéressante, les AGPs seraient impliquées dans la mort cellulaire des cellules d'*Arabidopsis* en culture (Gao et Showalter. 1999). L'apparition de la matrice extracellulaire dans le tissu de transmission est concomitante avec le début de la mort cellulaire (Fig. B 1 et 2). De ce fait, une déficience au niveau de la production de cette matrice chez le mutant *ntt* coïncide avec une absence de la mort cellulaire dans le tissu de transmission. La production de matrice extracellulaire dans ce tissu pourrait être directement liée à la dégénération des cellules (Crawford *et al.* 2007. Crawford et Yanofsky. 2008). En plus de ce rôle dans la mort cellulaire, la matrice extracellulaire a une fonction dans l'adhésion, le guidage et la nutrition des tubes polliniques (Lennon *et al.* 1998). Basés sur ces observations, nous avons étudié chez les plantes sauvages et le mutant *wscp-Salk* : (i) La production de matrice extracellulaire (partie 4 B) ; (ii) La mort cellulaire dans le tissu de transmission (partie 4 C et D).

4. A La matrice extracellulaire présente dans le tissu de transmission de *wscp-Salk* est similaire à celle du sauvage

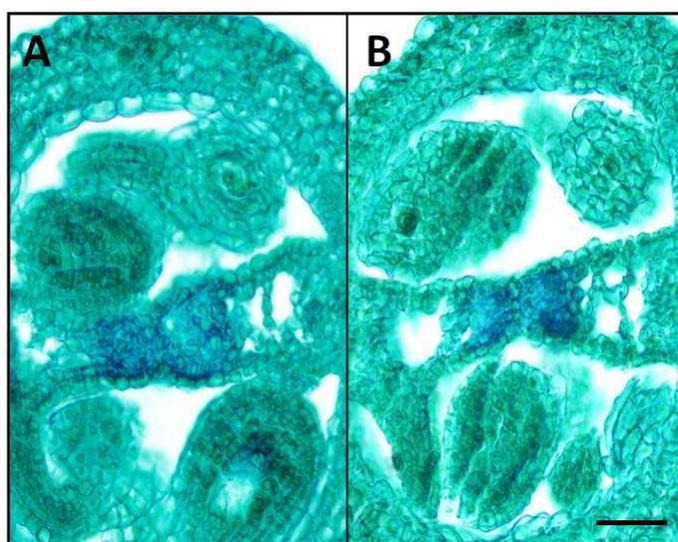


Figure 21 : Coloration au bleu d'alcan de la matrice extracellulaire du tissu de transmission chez le sauvage (A) et le mutant *wscp-Salk* (B).

Les fleurs au stade 12 sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections du style de 10 μ m sont réalisées. Les coupes sont colorées au bleu d'alcan puis au *Fast Green FCF*. Le bleu d'alcan colore les polysaccharides acides de la matrice extracellulaire et le *Fast Green FCF* colore le cytoplasme et les parois cellulaires. Barre d'échelle : 50 μ m.

Nous avons réalisé des coupes transversales de fleurs au stade 12 de plantes sauvages et du mutant *wscp-Salk*. Les tissus sont colorés dans un premier temps au bleu d'alcan (pour détecter les polysaccharides acides ; Lennon *et al.* 1998) puis au *Fast Green FCF*. Le second colorant permet de faire ressortir les parois cellulaires et le cytoplasme des cellules.

Dans la figure 21, la localisation et l'intensité de la coloration au bleu d'alcan sont identiques chez les fleurs du sauvage (A) et du mutant *wscp-Salk* (B). La production de polysaccharides acides de la matrice extracellulaire par les cellules du tissu de transmission est inchangée. D'autres stades du développement floral ont été étudiés et n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre *wscp-Salk* et le sauvage (résultats non montrés).

4. B La mort cellulaire est étendue aux cellules de l'épiderme du septum chez le mutant *wscp-Salk*

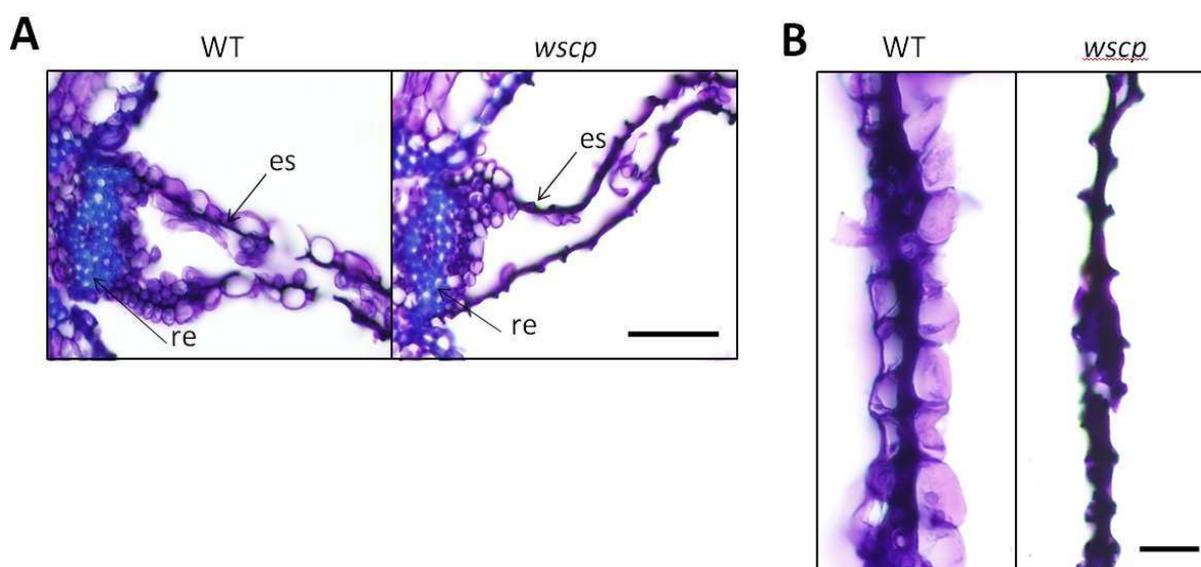


Figure 22 : Observation du septum et du replum colorés au bleu de toluidine de fleurs au stade 17 chez le sauvage (WT) et le mutant *wscp-Salk* (*wscp*).

Les fleurs au stade 17 sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections transversales du style de 10 μm sont réalisées. Le bleu de toluidine colore les parois celluliques en violet et les parois lignifiées en bleu. A) Replums et septums de fleurs au stade 17. Barre d'échelle : 50 μm . B) Parties centrales du septum de fleurs au stade 17. Barre d'échelle : 20 μm . es : épiderme du septum et re : replum.

Dans les stades tardifs du développement, des différences morphologiques sont visibles entre les pistils des plantes sauvages et mutantes *wscp-Salk* (Fig. 22). Des coupes transversales de pistils au stade 17 sont colorées au bleu de toluidine. Avec ce colorant, les parois celluliques sont roses et les parois lignifiées sont bleues/violettes. A ce stade, le tissu de transmission et la matrice extracellulaire ne plus présents. Les épidermes du septum sont

jointes chez le sauvage (Fig. 22 A et B partie gauche). Par contre, le mutant *wscp-Salk* présente une mort anormale des cellules de l'épiderme du septum au même stade (Fig. 22 A et B partie droite). L'espace intracellulaire n'est plus visible, cependant aucune différence n'a été observée au niveau du replum par rapport aux pistils des plantes sauvages.

Nous avons détecté de petites variations morphologiques au cours du développement floral chez les plantes sauvages et mutantes. Afin de mieux comprendre l'origine de ces différences, nous avons opté pour une étude de la mort cellulaire dans ce tissu sur des fleurs émasculées en nous basant sur un article de Crawford *et al.* (2007).

4. C La mort des cellules du tissu de transmission est accélérée dans le septum des fleurs émasculées *wscp-Salk*

La mort cellulaire se produit dans le septum lorsque les fleurs sont émasculées. La pollinisation n'est pas obligatoire dans ce processus (Crawford *et al.* 2007). Pour étudier en détail la mort cellulaire dans le septum, nous avons émasculé des fleurs au stade 12 puis nous les avons laissées 1 à 4 jours avant de les inclure dans la paraffine. Il est beaucoup plus facile de réaliser des observations sur des fleurs au même stade, soumises à un stress pendant une même durée que sur des inflorescences où chaque stade doit être retrouvé dans les coupes.

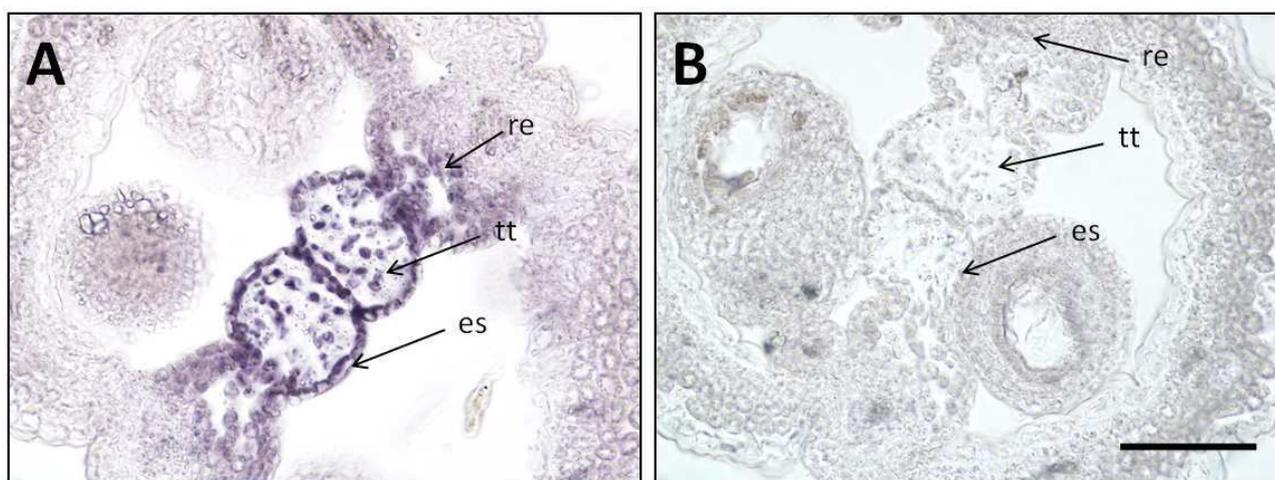


Figure 23 : Immunolocalisation de la protéine WSCP dans les fleurs sauvages (stade 12) émasculées pendant 2 jours.

Les fleurs sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μm du style sont réalisées. Les coupes sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine WSCP (A) ou du sérum préimmun (B). tt : tissu de transmission ; es : épiderme du septum ; re : replum. Barre d'échelle : 30 μm .

Nous avons vu précédemment une expression de la protéine WSCP dans le tissu de transmission et l'épiderme du septum des fleurs au stade 12 par immunolocalisation (partie

2.D). Nous avons réalisé la même expérience sur des fleurs au stade 12 mais cette fois-ci émasculées depuis 2 jours afin de s'assurer de la présence de WSCP dans le septum. En effet, ces conditions sont différentes de celles rencontrées lors du développement floral classique et l'expression de WSCP pourrait être différente. Dans la figure 23 A, la protéine WSCP est également retrouvée dans le tissu de transmission et dans l'épiderme du septum des fleurs. Contrairement aux résultats obtenus avec les fleurs fécondées, WSCP est aussi immunodétectée dans les cellules du replum adjacentes au tissu de transmission. Une nouvelle fois, aucun signal n'est observé avec le sérum préimmun utilisé comme anticorps primaire (Fig. 23 B).

Nous avons inclus dans la paraffine et réalisé des coupes transversales de fleurs 1 à 4 jours après émasculature. Ces sections ont été ensuite colorées seulement au *Fast Green FCF* (Fig. 24 A-I) ou également avec du bleu d'Alcian (Fig. 24 J et K).

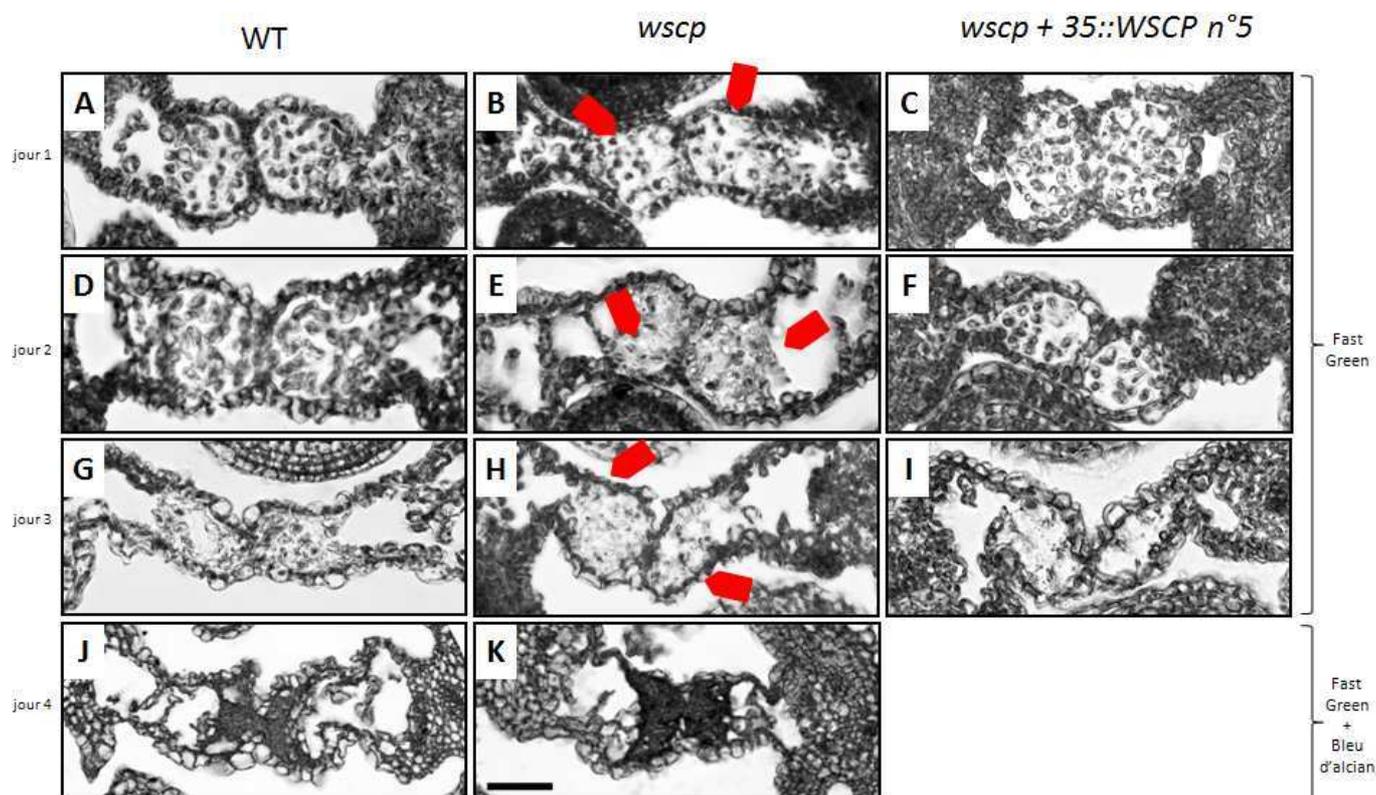


Figure 24 : Développement du tissu de transmission chez les fleurs non pollinisées du sauvage (WT), du mutant *wscp-Salk* (*wscp*) et du mutant *wscp-Salk* complété (*wscp + 35S::WSCP n°5*).

Les fleurs au stade 12 sont émasculées puis laissées 1 (A-C), 2 (D-F), 3 (G-I) ou 4 jours (J et K) avant d'être fixées et incluses dans la paraffine. Les sections de 10 μm sont colorées au Fast Green FCF (A-I) ou également avec du bleu d'alcian (J et K). Barre d'échelle : 25 μm . Les flèches rouges indiquent les différences observées chez *wscp-Salk* par rapport au sauvage.

Les différences sont marquées entre les fleurs du sauvage et mutant *wscp-Salk* 1 et 2 jours après émasculature. En effet, le nombre des cellules du tissu de transmission est très fortement diminué dans le septum des fleurs *wscp-Salk* par rapport au sauvage seulement 24 h

après émasculation (Fig. 24 A et B). Les cellules restantes ont une forme irrégulière chez le mutant contrairement au sauvage où celles-ci ont une forme ovale nette. Le nombre de cellules du tissu de transmission semble chez le sauvage inchangé entre le premier et le second jour d'émasculation des fleurs. Elles ont cependant une forme plus aplatie au second jour (Fig. 24 D). Le septum du mutant *wscp-Salk* est pratiquement dépourvu de cellules du tissu de transmission deux jours après émasculation. Une coloration floue est toutefois visible, probablement dû à la présence de débris cellulaires (Fig. 24 E).

Au troisième jour après émasculation, plus aucune cellule n'est présente dans le tissu de transmission du sauvage et du mutant *wscp-Salk* (Fig. 24 G et H). Les cellules de l'épiderme du septum ont par contre une forme très altérée chez le mutant *wscp-Salk*. L'espace intracellulaire de ces cellules n'est plus visible (Fig. 24 H). Le phénotype est très proche de celui observé au niveau des cellules de l'épiderme du septum des fleurs au stade 17 du mutant *wscp-Salk* (Fig. 22). A partir du quatrième jour d'émasculation, il est difficile de trouver des changements entre les lignées car tous les tissus du septum sont sénescents (Fig. 24 J et K).

WSCP est impliquée dans le contrôle de la mort des cellules du tissu de transmission et la préservation de l'intégrité des cellules de l'épiderme du septum. Le phénotype observé est bien dû à une absence de la protéine WSCP chez le mutant *wscp-Salk*. En effet, la lignée complémentée n°5 surexprimant WSCP présente un phénotype proche de celui observé dans les fleurs émasculées sauvages (Fig. 24 A, D, G contre C, F, I).

5 La mort précoce des cellules du tissu de transmission et celle anormale des cellules de l'épiderme du septum influence la croissance des tubes polliniques, la fécondation et la formation des graines.

5. A La croissance des tubes polliniques et leur sortie du septum sont faiblement altérées chez le mutant *wscp-Salk*

Crawford et Yanofsky ont suggéré que le tissu de transmission fonctionne comme une « voie expresse » pour les tubes polliniques en croissance (Crawford et Yanofsky, 2008). Nous nous sommes demandé si la mort cellulaire anormale observée dans le septum du mutant *wscp-Salk* pouvait influencer la croissance des tubes polliniques.

Nous avons réalisé dans un premier temps des pollinisations maximales. Des fleurs au stade 12 sont émasculées puis pollinisées 24 h après à l'aide d'un pinceau chargé de grains de pollen. Les pistils sont récupérés 2, 4 ou 6 h après pollinisation. Les tubes polliniques sont visualisés à l'aide du bleu d'aniline. Ce colorant se lie à la callose des tubes polliniques et les fait apparaître en bleu sous la lumière UV du microscope.

Les tubes polliniques qui progressent le plus rapidement dans le tissu de transmission parcourent environ 800 μm en 2 h, 1,3 mm en 4 h et 2 mm en 6 h chez les deux lignées (Fig. 25 A-C). Quelques différences sont toutefois visibles. Il y a de manière générale plus de tubes polliniques dans la partie la plus basale du tissu de transmission des pistils du mutant *wscp-Salk*. Et 6 h après pollinisation, de nombreux tubes polliniques quittent le tissu de transmission en direction des ovules chez le sauvage. Ce comportement est visiblement beaucoup plus rare chez le mutant *wscp-Salk* (Fig. 25 C voir les flèches).

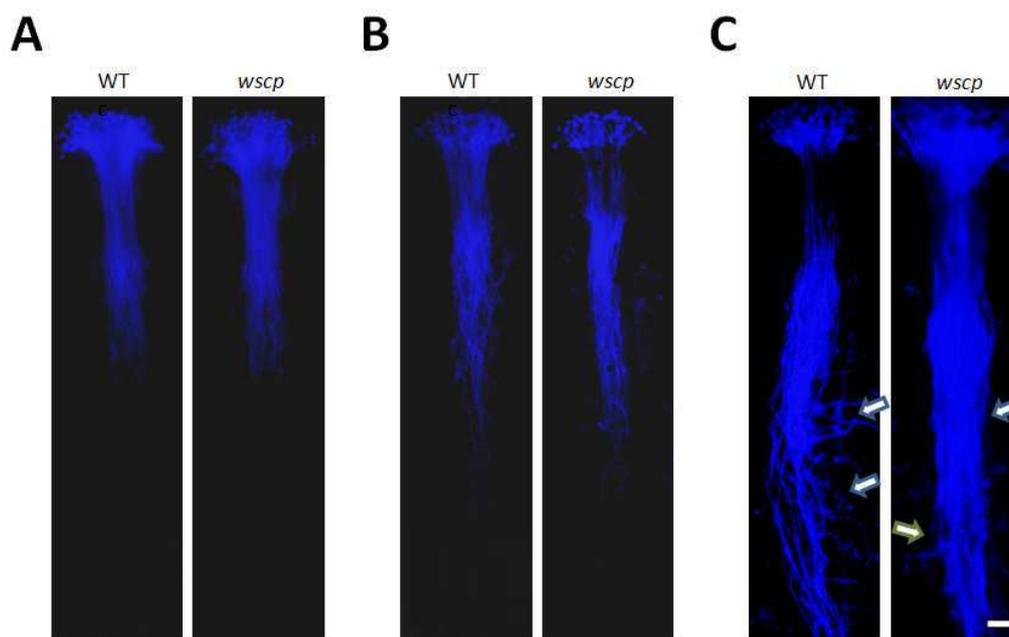


Figure 25 : Croissance des tubes polliniques en fonction du temps chez le sauvage (WT) et le mutant *wscp-Salk* (*wscp*).

24 h après émasculature des fleurs stade 12, les pistils sont pollinisées pendant 2 (A), 4 (B) ou 6 h (C) puis les tubes polliniques sont colorés au bleu d'aniline. Barre d'échelle : 100 μm . Les tubes polliniques fluorescent en bleu sous lumière UV.

5. B Morphologie des tubes polliniques et distribution des graines lors d'une pollinisation minimale

Les pollinisations minimales permettent de regarder en détail la morphologie d'un tube pollinique depuis le stigmate qu'il traverse jusqu'à l'ovule qu'il féconde. Des fleurs au

stade 12 sont émasculées et pollinisées le lendemain avec 1 à 5 grains de pollen déposés à l'aide d'un pinceau. Après 24 h d'attente, les tubes polliniques sont colorés au bleu d'aniline et observés sous lumière UV (cf. matériel et méthodes). Les photos ont été prises pour cette étude au niveau de la partie centrale de la chambre ovarienne pour toutes les lignées à l'exception du mutant *ntt* où les clichés ont été réalisés dans la partie apicale du style.

Les tubes polliniques peuvent présenter deux types de morphologies dans le pistil des fleurs sauvages. Ils sont fins, fortement colorés au bleu d'aniline et rectilignes lors de leur progression dans le tissu de transmission du septum (Fig. 26 WT ; image de gauche). Par contre, ils sont plus larges et courbés lorsqu'ils sortent du septum et qu'ils progressent sur l'épiderme du septum en direction de l'ovule (Fig. 26 WT ; image de droite). Chez le mutant *ntt*, les tubes polliniques ont tous une morphologie large et très courbée. Le septum ne subit pas de mort cellulaire ni ne produit de matrice extracellulaire nécessaire à la bonne croissance des tubes polliniques (Fig. 26 *ntt*). La progression des tubes polliniques est rendue difficile dans le septum et ils émergent ainsi dans la partie apicale du pistil (Crawford *et al.* 2007). La fécondation des ovules dans ces conditions n'est que partielle.

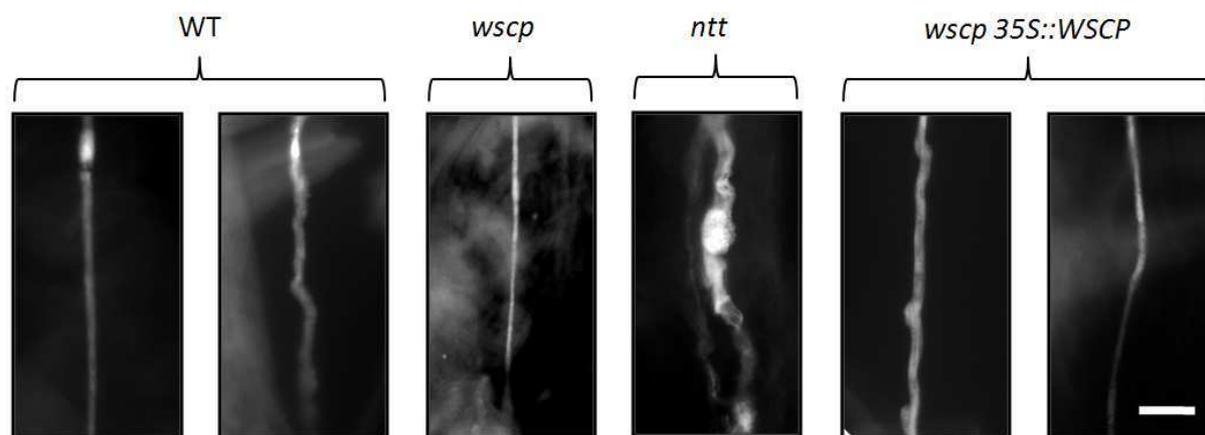


Figure 26 : Morphologie des tubes polliniques lors d'une pollinisation minimale chez le sauvage (WT), *wscp-Salk* (*wscp*), *ntt* et *wscp-Salk 35S::WSCP* (n°2, 5 et 8).

Des fleurs au stade 12 sont émasculées et laissées 24 h en chambre de culture. Les pistils sont ensuite pollinisés avec 1 à 5 grains de pollen déposés sur le stigmate à l'aide d'un pinceau. Après 24 h, les pistils sont colorés au bleu d'aniline. Les clichés sont pris au niveau de la partie centrale de la chambre ovarienne. Barre d'échelle : 5 μ m.

Environ 90 % des tubes polliniques du mutant *wscp-Salk* sont rectilignes, intensivement marqués et plus fins (30 tubes polliniques ont été analysés pour chaque lignée). Ce phénotype n'est plus visible dans le style des mutants *wscp-Salk* complémentés n°2, 5 et 8 décrits précédemment (Fig. 26 *wscp* et *wscp 35S::WSCP*). Les mutants complémentés ont des morphologies de tubes polliniques proches de celles observées dans les

fleurs sauvages avec une proportion équivalente de tubes polliniques fins et rectilignes ou courbés et larges (Fig. 26 WT et *wscp 35S::WSCP*).

Pourquoi le mutant *wscp-Salk* ne présente-t-il pas ou peu de tubes polliniques avec la seconde morphologie (larges et courbés)? Deux hypothèses sont envisageables. Une possibilité, la moins probable selon nous, serait que les tubes polliniques effectuent la plus courte distance possible vers l'ovule en conservant leur morphologie après leur émergence du septum. Les tubes polliniques ont une morphologie typique en théorie d'un trajet dans le tissu de transmission (fins et rectilignes). La seconde possibilité est qu'ils doivent probablement parcourir une plus longue distance à l'intérieur du septum contrairement au sauvage.

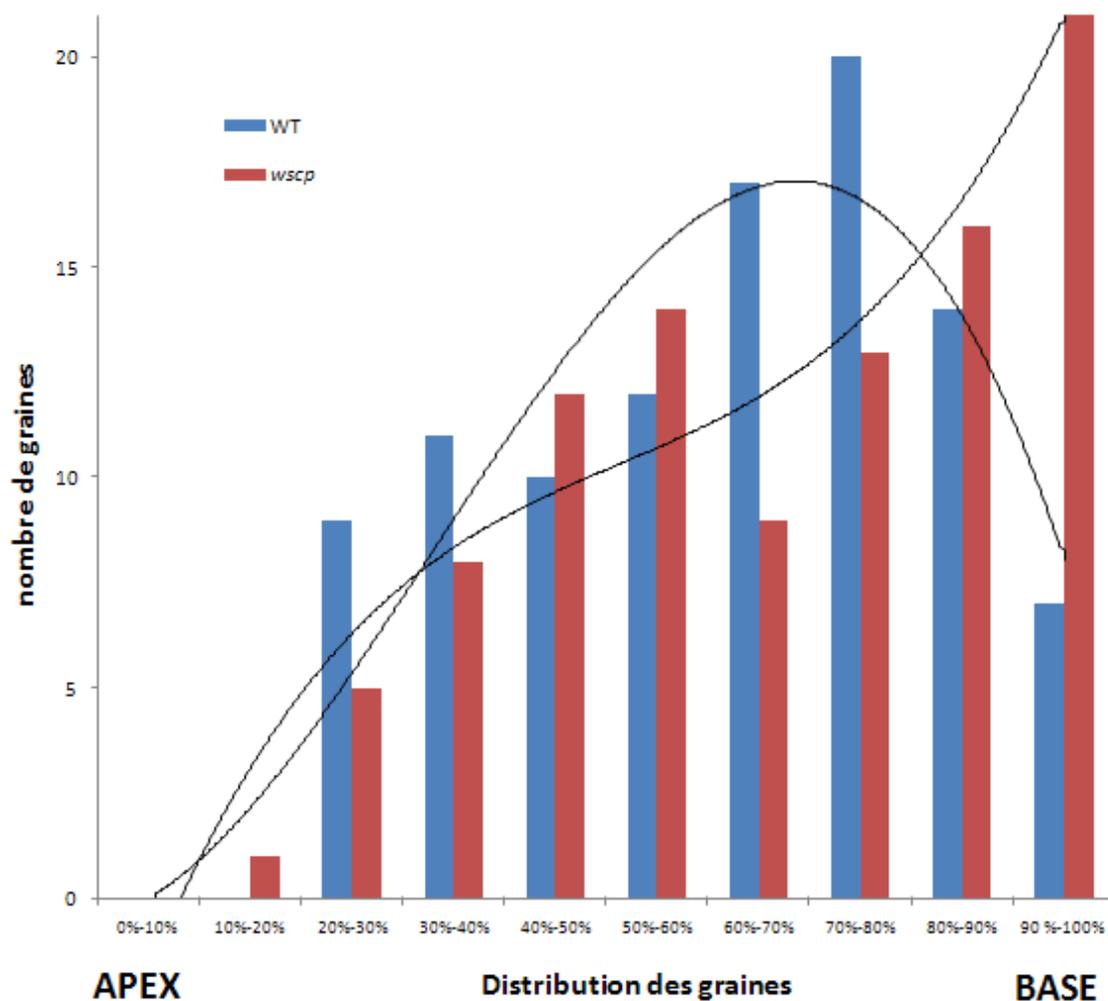


Figure 27 : Distribution des graines dans les fruits du sauvage (WT) et du mutant *wscp-Salk* (*wscp*) suite à une pollinisation minimale.

Des fleurs au stade 12 sont émasculées et laissées 24 h en chambre de culture. Les pistils sont ensuite pollinisés avec 1 à 5 grains de pollen. En abscisse, la longueur du fruit est divisée en portions de 10 percentiles de la partie la plus apicale (1%-10%) à la partie la plus basale (90%-100%). Le nombre de graines pour chaque portion de 10 percentiles est donné en ordonnée. Les traits noirs représentent les courbes de tendance.

Les changements probables de la composition de la matrice extracellulaire, la mort précoce des cellules du tissu de transmission (Fig. 24) et la mort inhabituelle des cellules du septum (Fig. 22) pourrait influencer positivement la croissance des tubes polliniques du mutant *wscp-Salk* (Fig. 25 et 26). Pour appuyer cette idée, nous avons également entrepris des fertilisations minimales.

Dans cette expérience, les fleurs sont également émasculées au stade 12 puis pollinisées 24 h après avec 1 à 5 grains de pollen. Les pistils sont laissés plusieurs jours jusqu'à formation des graines (cf. matériel et méthodes). La distribution des graines dans la chambre ovarienne du sauvage (n=100) et du mutant *wscp-Salk* (n=100) est ensuite déterminée. La chambre ovarienne est divisée en 10 percentiles, de la partie la plus apicale (1-10 %) à la partie la plus basale (90-100 %).

Un peu plus d'un quart des graines est retrouvé dans la première moitié de la chambre ovarienne des pistils du sauvage et du mutant *wscp-Salk* (respectivement 30 et 26% ; Fig. 27). Les différences entre les deux lignées sont plus marquées dans la seconde partie de la chambre ovarienne (50-100 %). Les ovules sont fécondés préférentiellement dans la partie la plus basale de la chambre ovarienne (80-100 %) chez le mutant *wscp-Salk* : 37 % contre 21 % pour le sauvage. Les graines sont par contre plus représentées au milieu de la chambre ovarienne (50-80 %) dans les pistils du sauvage avec 49 % contre 36 % pour le mutant *wscp-Salk* (Fig. 27). Les résultats obtenus lors des fertilisations minimales sont en accord avec les pollinisations minimales (Fig. 26) : chez le mutant *wscp-Salk*, les tubes polliniques progressent davantage dans le tissu de transmission et ils fécondent préférentiellement les ovules situées dans la partie basale de la chambre ovarienne après leur émergence du septum.

5. C Les graines du mutant *wscp-Salk* présentent des différences mineures avec les graines du sauvage

Dans les parties précédentes, nous avons vu une mort anormale des cellules du septum des fleurs *wscp-Salk* au cours de leur développement. Nous nous sommes demandé si cela pouvait influencer le développement de la graine chez ce mutant.

Nous avons donc comparé les graines du sauvage et du mutant *wscp-Salk* après un développement floral normal (Fig. 28 A). Le nombre de graines par silique est identique entre les deux lignées dans les conditions testées avec en moyenne 40 graines. Cependant, les

graines du mutant *wscp-Salk* sont plus sombres que celles du sauvage (Fig. 28 A). Cette différence est encore plus marquée pour les graines conservées au laboratoire depuis 3 ans (Résultat non montré). Les différences de couleur sont peut-être dues à une accumulation plus importante d'anthocyanes qui est produite notamment lors de stress. Nous avons également remarqué une baisse de vitalité des graines *wscp-Salk* lors des tests de germination. Pour cette expérience, les graines sont disposées sur du milieu MS et placées pendant 2 jours à 4°C afin de synchroniser leur germination. Les graines sont ensuite exposées à la lumière et les graines germées sont dénombrées sous loupe binoculaire après 24, 30 et 41 h (Fig. 28 E). Une graine est considérée comme germée lorsque son enveloppe est brisée. Les graines du mutant *wscp-Salk* présentent un important retard de germination après 24 et 30 h d'exposition à la lumière. Ainsi, seulement 1,8 % des graines du mutant ont germé contre 23,6% pour les graines sauvages après 1 jour à la lumière (Fig. 28 E). Malgré ce retard sensible de germination, plus aucune différence n'est observée au stade de la sortie des cotylédons (résultats non montrés ; Romain Manceau, stagiaire de l'Institut National d'Horticulture d'Anger).

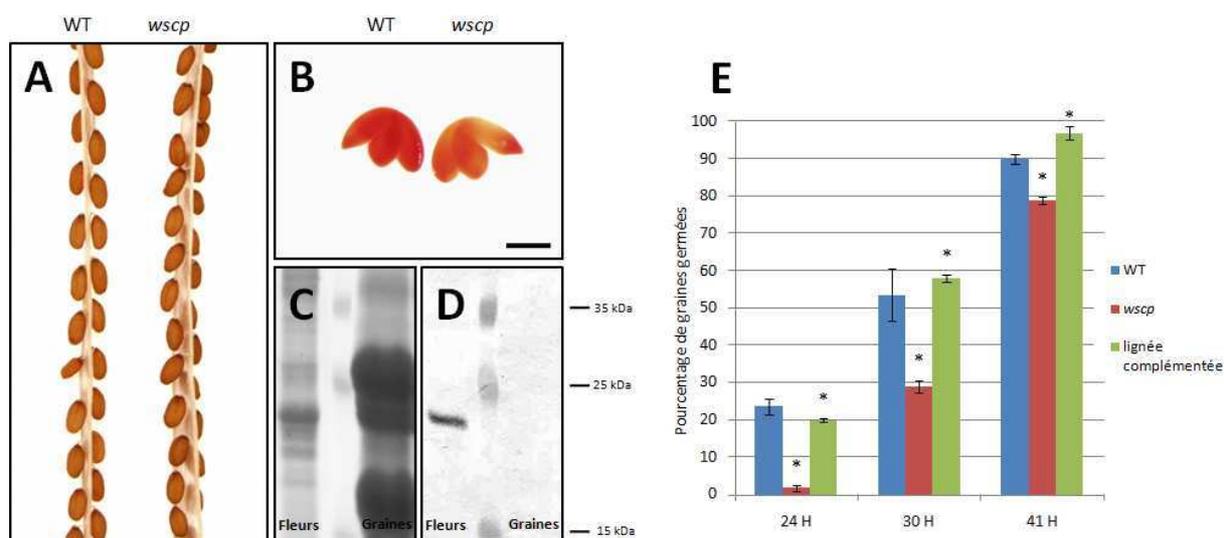


Figure 28 : Caractérisation des graines du sauvage (WT) et du mutant *wscp-Salk* (*wscp*)

A) Graine du sauvage et du mutant *wscp-Salk* dans leur silique.

B) Vitalité des embryons observée par coloration au chlorure de tetrazolium. Barre d'échelle : 200 µm.

C) SDS-PAGE et coloration des protéines de fleurs ou de graines sauvages au bleu de Coomassie (80 µg de protéines par puits).

D) Immunodétection de WSCP par un anticorps dirigé contre la protéine (80 µg de protéines par puits).

E) Test de germination des graines sauvages, du mutant *wscp-Salk* et mutant *wscp-Salk* complémenté n°5. Après une vernalisation de 2 jours à 4°C, les graines sont exposées à la lumière pendant 24, 30 ou 41 h. Les astérisques indiquent les valeurs correspondant à des changements significatifs par rapport aux contrôles sauvages d'après le test ANOVA (programme *StatL*). Ces résultats sont issus d'une moyenne des valeurs de trois expériences.

La vitalité des embryons au cours du développement a été testée par coloration au chlorure de tetrazolium (Fig. 28 B). Le tetrazolium donne une couleur rouge proportionnelle à l'activité enzymatique des mitochondries (Ondzighi *et al.* 2008). Les embryons du mutant *wscp-Salk* ont une couleur moins prononcée que ceux du sauvage (Fig. 28 B). Les embryons

du mutant pourraient subir un stress au cours de leur développement, entre autres au niveau des mitochondries, dont les conséquences seraient répercutées dans les graines sèches. Les différences de vitalité des embryons au cours du développement et de germination ne proviennent pas d'un défaut de WSCP dans ces tissus. En effet, la protéine n'est pas exprimée dans les graines sèches et aucun transcrite correspondant n'est détecté par *microarray* au cours de l'embryogénèse (Fig. 28 C et D ; Swanson *et al.* 2005).

6 WSCP interagit dans la levure avec les protéases à cystéine

Les protéines WSCP ont un domaine Kunitz retrouvé chez les inhibiteurs de protéases à sérine (Satoh *et al.* 2001). Mais à ce jour, aucune activité d'inhibition par les WSCP n'a été mise en évidence contre cette famille de protéases (Ilamis *et al.* 1997 ; Nishio et Satoh. 1997 ; Chapitre 1 partie 2.C). Par contre, dans des travaux récents, une équipe a purifié la protéase impliquée dans la maturation de la protéine proaleurine chez le chou-fleur (*Brassica oleracea*). Une protéine à domaine Kunitz de la famille des WSCP copurifie avec cette protéase à cystéine (Halls *et al.* 2005). La même équipe a identifié dans un second temps les homologues de ces protéines chez *Arabidopsis thaliana* : WSCP et la protéase à cystéine codée par le gène At3g19390. WSCP s'est avéré être un inhibiteur de cette protéase de maturation de la proaleurine (At3g19390) *in vitro* (Halls *et al.* 2006). La protéase codée par At3g19390 appartient à la famille des protéases à cystéine avec un domaine granuline en C-terminal. C'est une petite famille de 4 membres chez *Arabidopsis* qui comprend les gènes : At3g19390, At5g43060, RD21 et XBCP3. Les granulines ont été caractérisées ces dernières années principalement dans les cellules animales où leur fonction serait, entre autres, de réguler la prolifération cellulaire (Bateman et Bennett. 1998). La fonction de ce domaine dans la plante est encore floue, mais il pourrait jouer un rôle dans l'agrégation des protéases à pH acide (Yamada *et al.* 2001).

Dans la figure 29, nous avons étudié l'interaction entre WSCP et les protéases à cystéine avec un domaine granuline dans les levures par double hybride. Les levures cotransformées poussent toutes sur milieu permissif quelque soit les combinaisons entre les proies et les cibles (Fig. 29 A et C), donc les constructions exprimées dans la levure ne sont pas toxiques. Sur milieu sélectif, seules les levures exprimant WSCP comme cible et RD21 comme proie poussent (Fig. 29 B). Dans cette configuration WSCP et RD21 interagissent

dans la levure. En effet, aucune colonie sur boîte n'est observée avec les protéases à cystéine comme proie et PORB (protochlorophyllide oxydoréductase B) ou le vecteur vide comme cible.

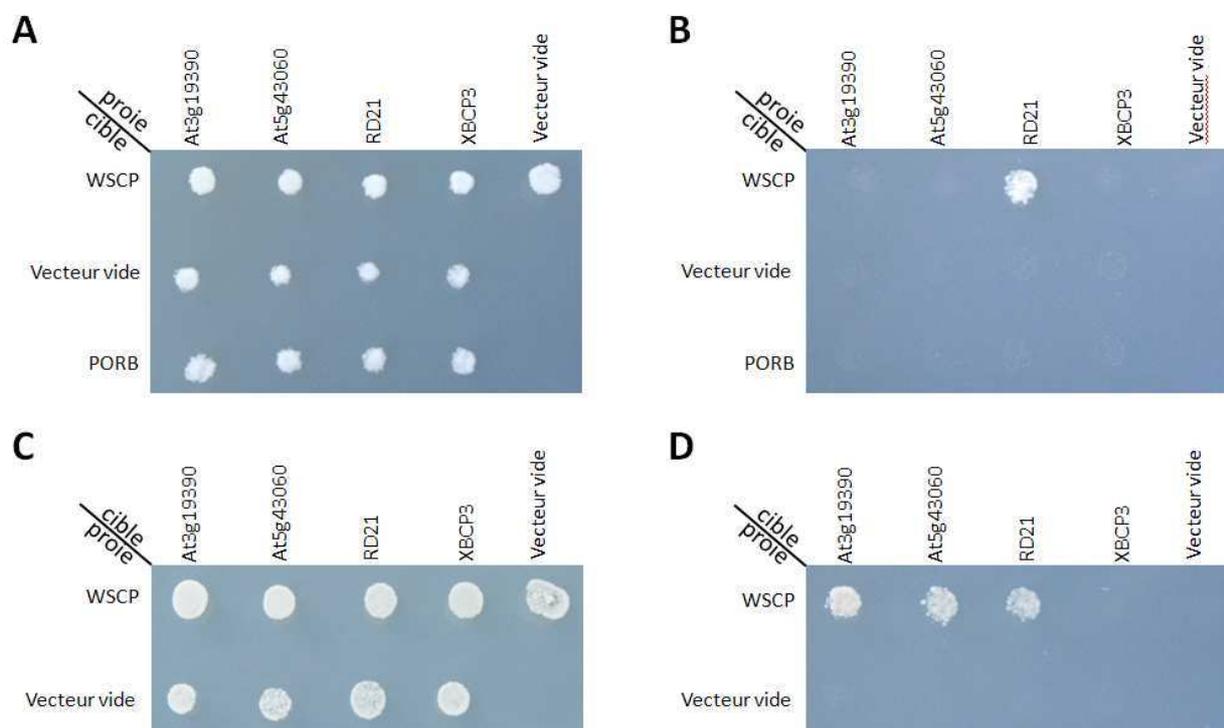


Figure 29 : Test double hybride entre WSCP et les protéases à cystéine contenant un domaine granuline.

Les séquences codantes de WSCP, PORB ou le vecteur vide sont utilisés comme cible et celle protéases à cystéines (At3g19390, At5g43060, RD21 et XBCP3) ou le vecteur vide comme proie (A et B). La séquence codante de WSCP ou le vecteur vide sont utilisés comme proie et les protéases à cystéine ou le vecteur vide comme cible (C et D). Le milieu permissif (A et C) est dépourvu de L-leucine et de L-tryptophane tandis que le milieu sélectif ne contient pas de L-histidine et d'adénine en plus des deux acides aminés précédents. Une croissance sur milieu sélectif indique une interaction protéine-protéine dans la levure.

Par contre, lorsque WSCP est utilisée comme proie, RD21 et les protéases à cystéine codées par At3g19390 et At5g43060 interagissent avec WSCP (Fig. 29 D). Les levures poussent sur milieu permissif sauf pour la combinaison avec la protéase à cystéine XBCP3.

WSCP interagit dans la levure avec trois des quatre protéases à cystéine contenant un domaine granuline. Nous confirmons donc dans la levure, l'interaction observée entre WSCP et la protéase à cystéine codée par At3g19390 *in vitro* par Hall *et al.* en 2006.

Nous avons tenté de montrer sans succès l'interaction entre WSCP et les protéases à cystéine d'une autre manière. Des coimmunoprécipitations de la protéine WSCP se sont révélées infructueuses avec l'utilisation d'anticorps anti-WSCP (purifiés ou non) couplés à la protéine A sepharose. Des surproductions de ces protéases ont été également réalisées mais nous ne sommes pas arrivés à les rendre actives que ce soit par renaturation sur colonne,

traitements SDS 2% ou pH acides. Elles ne clivent pas leur « *prodomain* » N-terminal qui inhibe leur activité (résultats non-montrés).

RD21 est exprimée dans le tissu de transmission, l'épiderme du septum et dans d'autres parties de l'ovaire.

Afin de savoir si le partenaire RD21 de WSCP dans la levure est exprimé également dans le septum, nous avons réalisé une immunolocalisation dans les pistils de fleurs au stade 12. Cette protéase à cystéine avec un domaine granuline a été choisie car c'est la seule de cette petite famille de protéine à être étudiée en détail et dont les anticorps sont disponibles (gracieusement donnés par Ikuko Hara-Nishimura de l'Université de Kyoto).

Les immunolocalisations révèlent une expression ubiquitaire de RD21 dans l'ovaire des fleurs (Fig. 30 A et B). La protéine est immunodétectée comme WSCP dans le tissu de transmission et l'épiderme du septum au même stade du développement floral (Fig. 30 A et Fig. 19 E). L'immunomarquage est plus prononcé au niveau des cellules du xylème présentes dans le replum et dans les valves.

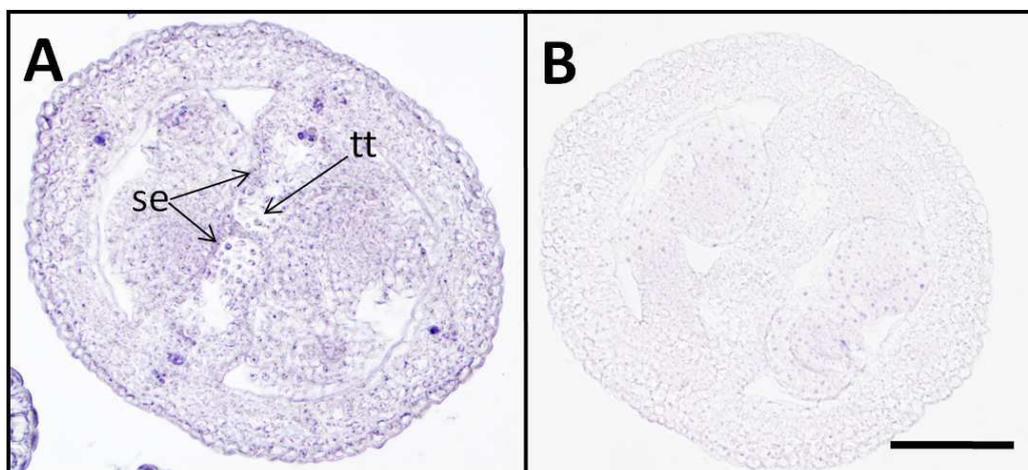


Figure 30 : Immunolocalisation de la protéine RD21 dans le pistil des fleurs au stade 12.

Les fleurs sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μm sont réalisées. Les coupes sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine RD21 (A) ou du sérum préimmun (B). Barre d'échelle : 50 μm .

Par ailleurs, un immunomarquage plus important a été remarqué dans les cellules du sac pollinique (résultats non montrés). Elles subissent une mort cellulaire programmée entre les stades 12 et 13 du développement floral, moment de la libération des grains de pollen. RD21 pourrait être impliquée dans le processus de mort programmée des cellules du tissu de transmission et du sac pollinique lors du développement floral.

CHAPITRE III

**Expression de la protéine WSCP dans les plantules
étiolées**

Dans la partie I, nous avons vu une expression par western blot de la protéine WSCP uniquement dans les inflorescences et les plantules étiolées (Fig. 9 et 10). L'étude approfondie de l'expression de WSCP dans la plantule étiolée et de ses régulations fait l'objet de cette 3^{ème} partie.

1 WSCP est exprimée dans les plantules étiolées

1. A WSCP est présente dans la crosse apicale des plantules étiolées

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression de WSCP dans les plantules étiolées par RT-PCR semi-quantitative et par western blot (Fig. 31).

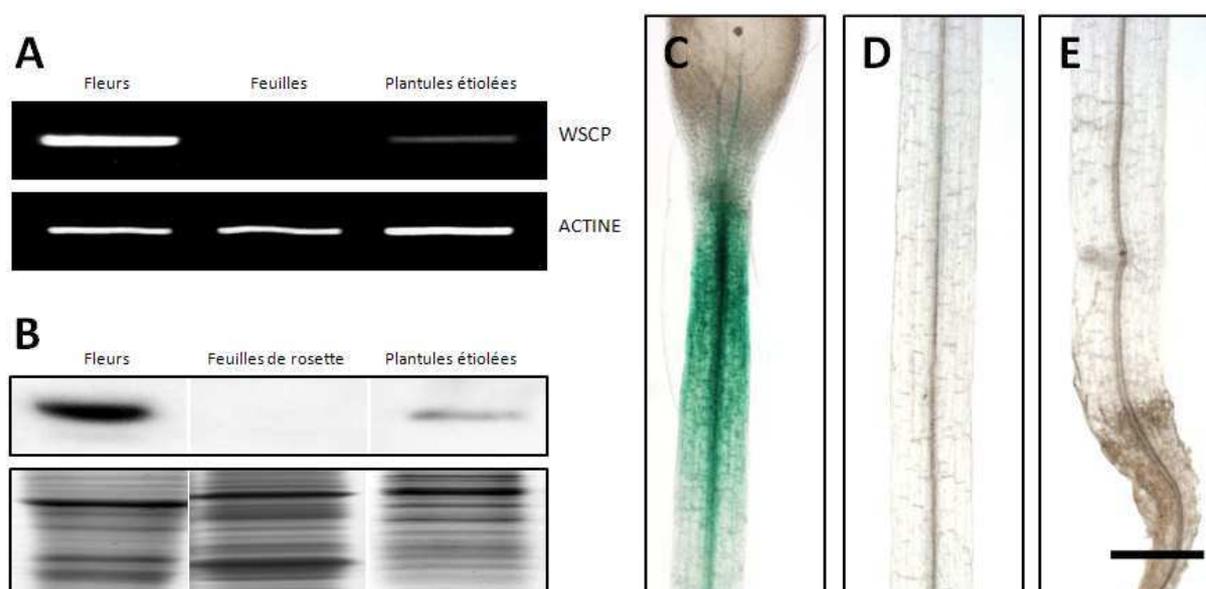


Figure 31 : Expression de WSCP dans les plantules étiolées 3 jours.

Les ARN ou les protéines des plantules étiolées et des plantes sauvages (3 semaines) sont extraits pour les expériences de RT-PCR (A) ou de western blot (B).

A) Expression du gène WSCP. Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative. Le nombre de cycle d'amplification pour chaque jeu d'amorces a été déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. L'ARN *actine* est utilisé comme gène contrôle. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%.

B) Profil d'expression de la protéine WSCP dans les fleurs, les feuilles de rosette et les plantules étiolées. 50 µg de protéines totales du sauvage (WT) sont déposés par puits. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie (Partie inférieure) ou transférées sur membrane et immunodétectées avec un anticorps dirigé contre WSCP (Partie supérieure)

C-E) Analyse de l'expression du promoteur du gène WSCP dans les plantules étiolées *pWSCP::GUS*. Les plantules sont colorées et les différentes parties de l'hypocotyle ont été photographiées.

Dans l'expérience de RT-PCR semi quantitative, les amorces du gène *ACTINE* ont été utilisées comme contrôle. En effet son expression est considérée comme ubiquitaire (Fig.31 A). Le transcrit *WSCP* est plus représenté dans les inflorescences que dans les plantules étiolées. En revanche, aucun transcrit n'est détecté dans les feuilles (Fig. 31 A). Des quantités

identiques de protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE et une étude par western blot a été réalisée avec un anticorps dirigé contre WSCP. Le niveau de protéine détecté est plus faible dans les plantules étiolées que dans les fleurs (Fig. 31 B). Les profils similaires obtenus par RT-PCR et western blot vont dans le sens d'un contrôle transcriptionnel de l'expression de WSCP. Des immunolocalisations ont été réalisées sans succès, probablement à cause du faible taux d'expression de WSCP et de l'important bruit de fond obtenu avec ce type de tissus (résultats non montrés).

Nous avons dans un second temps regardé l'activité du promoteur du gène WSCP par GUS en utilisant les mêmes lignées. Au sein des plantules étiolées, le promoteur est actif uniquement dans la crosse apicale (Fig. 31 C-E). Cette structure n'a pas été conservée lors de la préparation des échantillons entre lame et lamelle dans la figure 31 (l'échantillon a été allongé pour le cliché). La courbure de la crosse apicale est impliquée, de par sa forme, dans la protection des cotylédons et du méristème apical caulinaire lors de l'émergence de la jeune plantule. De plus, le marquage GUS est plus important à proximité des tissus conducteurs et n'est pas présent dans les cotylédons (Fig. 31 C-E). Ce résultat nous a surpris car nous pensions avoir affaire à une protéine impliquée dans le stockage transitoire de précurseurs de la chlorophylle lors du dé-étiolement comme chez l'orge (*Hordeum vulgare* ; Reinbothe *et al.* 2004). En effet, ce n'est vraisemblablement pas dans la crosse apicale mais dans les cotylédons que se synthétise principalement la chlorophylle au cours du dé-étiolement. Le rôle de la protéine au cours du dé-étiolement sera traité ultérieurement.

1. B Le mutant nul *wscp-Salk* et le surexpresser *35S::WSCP* n'ont pas de phénotype particulier lors de la skotomorphogénèse

Les protéines à domaine Kunitz ont de nombreuses fonctions physiologiques comme inhibiteurs d'enzymes, protéines de stockage (Kortt *et al.* 1989) ou encore agents de défense contre les pathogènes et/ou insectes (Boulter. 1993 ; Ryan. 1990). Récemment, des protéines de la même famille ont été localisées dans les tissus conducteurs de l'hypocotyle et dans la crosse apicale des plantules étiolées de pois-chiche (*Cicer arietinum* ; Jiménez *et al.* 2007). Ces protéines, de par leurs localisations, auraient une implication dans les processus d'élongation cellulaire et de régulation de la mort cellulaire lors de la formation du xylème et du phloème (Jiménez *et al.* 2007). Nous avons souhaité tester une partie de ces hypothèses en

effectuant des mesures de longueur d'hypocotyles chez les plantules sauvages et mutantes (*wscp-Salk*) ou surexprimant la protéine WSCP (*35S::WSCP*).

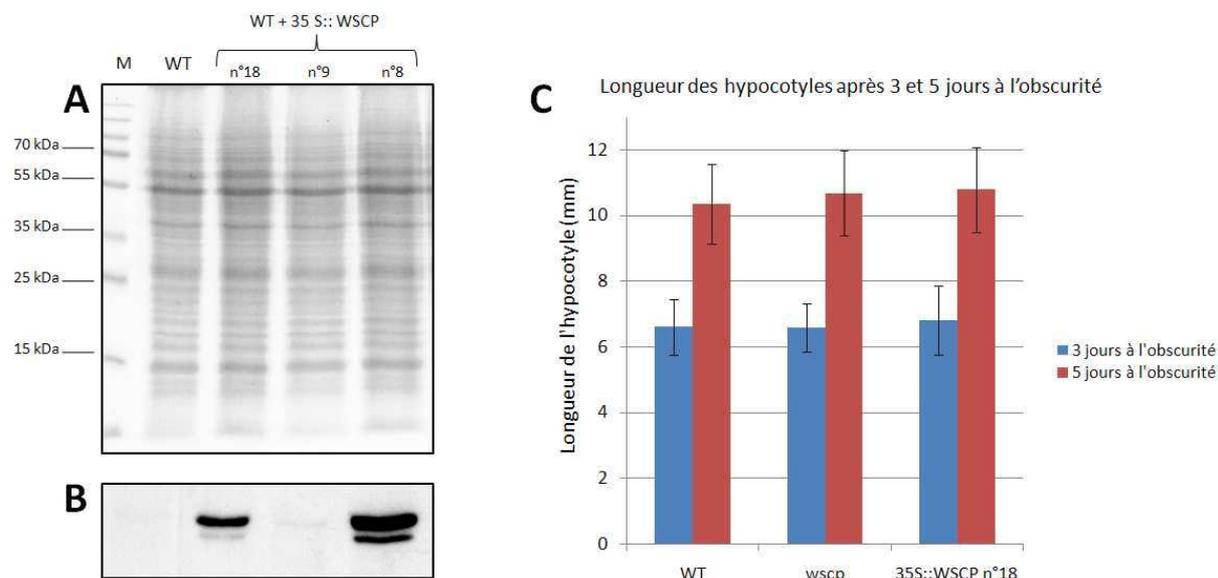


Figure 32 : Longueur des hypocotyles des plantules étiolées sauvages, mutantes *wscp-Salk* et *35S::WSCP*.

A et B) Profil d'expression de la protéine WSCP dans la génération T3 des lignées indépendantes *35S::WSCP*. 30 µg de protéines totales du sauvage (WT) ou des lignées indépendantes T3 *35S::WSCP* sont déposés par puits. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie (A) ou transférées sur membrane et immunodétectées avec un anticorps dirigé contre WSCP. M : marqueur de poids moléculaire.

C) Longueur des hypocotyles des plantules étiolées sauvages, mutantes *wscp-Salk* et *35S::WSCP* après 3 et 5 jours (n=50 pour chaque lignée pour chaque prélèvement).

Les surexpresseurs *35S::WSCP* ont été obtenus par transformation de plantes sauvages par *Agrobacterium tumefaciens*. La construction introduite chez le sauvage est la même que celle utilisée pour les complémentations fonctionnelles du mutant *wscp-Salk*. Les protéines de plante T3 de trois lignées indépendantes *35S::WSCP* ont été extraites, séparées par gel SDS-PAGE et visualisées au bleu de Coomassie ou soumises à une étude par western blot avec un anticorps dirigé contre WSCP (Fig. 32 A et B). La protéine WSCP n'est pas immunodétectée dans les feuilles du sauvage ou très faiblement chez le surexpresseur n°9. Les deux autres lignées présentent une importante expression de la protéine WSCP (Fig. 32 B). La lignée *35S::WSCP* n°18 a été sélectionné pour la prochaine expérience.

Dans la figure 32 C, nous avons mesuré la longueur de l'hypocotyle des plantules étiolées. Les différences ne sont pas significatives entre le sauvage, *wscp-Salk* et le surexpresseur *35S::WSCP* n°18 (test t de Student ; $p \geq 0,5$). Leurs hypocotyles mesurent en moyenne 6,5 mm et 10,5 mm après respectivement 3 et 5 jours à l'obscurité. Nous avons également observé la formation de la crosse apicale au cours de la skotomorphogénèse et une

fois encore, aucune différence n'est ressortie de cette étude (résultats non montrés ; expériences basées sur article de Raz et Ecker. 1999).

2 Les facteurs de transcription NTT et HECATE régulent la transcription du gène *WSCP* à l'obscurité

Dans le pistil, NTT et HECATE3 jouent un rôle dans la régulation de la protéine WSCP (Partie II). Nous nous sommes demandé si ces mêmes facteurs de transcription sont également impliqués dans la régulation de WSCP dans les plantules étiolées. Cela nous a semblé possible car on trouve dans la littérature l'exemple du gène *SPATULA*. Ce facteur de transcription est impliqué dans le développement floral comme NTT ou HECATE3 et au cours de la germination (Alvarez et Smyth. 1999 ; Penfield *et al.* 2005). Par ailleurs, toutes les protéines HECATE sont capables d'interagir avec SPATULA dans la levure par double hybride (Gremski *et al.* 2007). Nous avons donc commencé par vérifier la présence des transcrits *NTT*, *HEC1* et *HEC3* par RT-PCR semi-quantitative dans les plantules étiolées sauvage.

2.A Les gènes *NTT* et *HEC* sont exprimés dans les plantules étiolées



Figure 33 : Expression des gènes codant pour les facteurs de transcription NTT et HECATE dans les plantules étiolées 3 jours.

Les ARNm ont été extraits à partir de tissus de plantes âgées de 3 semaines (feuilles et fleurs) ou de plantule étiolées. Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative. Le nombre de cycle d'amplification pour chaque jeu d'amorces a été déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. L'ARN *actine* est utilisé comme gène contrôle. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%.

Nous avons purifié les ARNm à partir de tissus de fleurs et de feuilles de plantes âgées de 3 semaines ainsi que de plantules étiolées pour les expériences de RT-PCR (Fig. 33). Les

transcrits de ces facteurs de transcription sont présents comme attendu dans les fleurs et absents dans les feuilles à l'exception de *ntt* qui est faiblement représenté dans les deux types d'organe. De manière inattendue, tous les transcrits sont également exprimés dans les plantules étiolées. Il est à noter que le transcrit *HEC1* est nettement plus exprimé dans les plantules étiolées que dans les fleurs où il a été caractérisé pour la première fois (Gremski *et al.* 2007).

2. B La transcription du gène *WSCP* est régulée différemment par les facteurs de transcription NTT et HECATE dans les plantules étiolées

Nous avons étudié le niveau de transcrits *WSCP* chez les plantules mutantes étiolées *ntt*, *hec1*, *hec1 hec3* et *35S::HEC1* par RT-PCR semi-quantitative (Fig. 34). Les mutants nuls pour les facteurs de transcription NTT et HECATE n'expriment pas les transcrits correspondants (Fig. 34, ligne 2 à 4). Le facteur de transcription HEC1 est impliqué directement ou indirectement dans la régulation positive du transcrit *WSCP*. En effet, aucun transcrit n'est détecté chez les mutants *hec1* et *hec1 hec3*. Cette régulation est confirmée par le résultat obtenu avec le mutant *35S::HEC1* chez lequel *WSCP* est très nettement surexprimé par rapport au sauvage (Fig. 34, ligne 1).



Figure 34 : Expression du gène codant pour *WSCP* chez les plantules étiolées des mutants pour les facteurs de transcription NTT et HECATE.

Les ARNm ont été extraits à partir de plantules étiolées 3 jours du sauvage (WT), des mutants *ntt* (Crawford *et al.* 2007), *hec1*, double mutant *hec1 hec3* et du surexprimeur *35S::HEC1* (Gremski *et al.* 2007). Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR. Le nombre de cycles d'amplification pour chaque jeu d'amorces a été déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. L'ARN *actine* est utilisé comme contrôle. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%.

Par ailleurs, le transcrit *WSCP* augmente chez le mutant *ntt* ce qui suggère que le facteur de transcription *NTT* serait un répresseur du transcrit *WSCP* dans les plantules étiolées. La régulation de *WSCP* dans les plantules étiolées diffère de celles que nous avons mise en évidence dans la fleur où les facteurs de transcription *NTT* et *HECATE3* régulent tous les deux positivement le niveau de la protéine *WSCP* (Fig. 20 A et B).

2. C Le promoteur du gène *HEC1* est actif dans la crosse apicale et les cotylédons

Dans la figure 35, nous avons étudié l'activité du promoteur *HEC1* fusionné au gène rapporteur *GUS* dans les plantules étiolées 3 jours (Gremski *et al.* 2007). L'activité *GUS* est absente dans les parties centrales et basales de l'hypocotyle et dans les racines. Par contre, un marquage *GUS* est important au niveau de la crosse apicale et dans les cotylédons.



Figure 35 : Analyse de l'expression du promoteur du gène *HEC1* dans les plantules étiolées 3 jours.
Des plantules étiolées 3 jours ont été colorées et photographiées. Barre d'échelle : 500 μ m.

Nous avons montré une expression des gènes *NTT* et *HECATE* dans les plantules étiolées (Fig. 33) et leurs influences sur le transcrit *WSCP* par RT-PCR (Fig. 34). De plus, la colocalisation dans la crosse apicale de l'activité des promoteurs *HEC1* et *WSCP* conforte l'hypothèse d'une régulation positive du transcrit *WSCP* par le facteur de transcription *HEC1* (Fig. 34 et 35). Cependant cette co-expression est restreinte à la crosse apicale et celle-ci n'est pas trouvée dans les cotylédons.

3 Les hormones impliquées dans la formation de la crosse apicale régulent *WSCP*

La crosse apicale est une structure qui permet de protéger les cotylédons lors de l'émergence hors du sol (Vandenbussche et Van Der Straeten. 2004). Sa formation fait intervenir les principales phytohormones connues, comme l'éthylène, les brassinostéroïdes, l'auxine et les gibbérellines (Dugardeyn *et al.* 2008). Nous avons souhaité caractériser l'influence de ces hormones et des facteurs de transcription NTT/HECATE sur l'expression du gène *WSCP* au cours de la skotomorphogénèse.

3. A L'éthylène, les brassinostéroïdes et l'auxine influencent le niveau des transcrits *WSCP*

Les plantules *pWSCP::GUS* sont laissées 3 jours à l'obscurité sur milieu MS agar supplémenté en hormones et/ou en inhibiteurs d'hormones mais dépourvu de sucrose (Fig. 36). Cette source de carbone est connue pour interférer avec certaines hormones comme l'éthylène (Gazzarrini et McCourt. 2001).

En absence d'hormone ou présence de gibbérelline, le promoteur *WSCP* est actif dans la crosse apicale avec une coloration GUS plus marquée dans les tissus conducteurs centraux de la plantule étiolée.

Les plantules étiolées exposées au précurseur direct de l'éthylène (ACC pour Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique ; Guzman et Ecker. 1990) présentent un phénotype caractéristique de la « triple réponse » : l'hypocotyle est plus court, la croissance des racines est inhibée et la longueur de la crosse apicale est exagérée allant jusqu'à former une boucle. Chez ces plantules, le marquage GUS est plus étendu et plus intense qu'en absence d'hormone. Nous nous attendions à cela car des expériences de *microarray* ont montré une augmentation d'un facteur 8 du transcrit *WSCP* dans les plantules étiolées 3 jours en présence du gaz éthylène (Alonso *et al.* 2001). En présence d'un inhibiteur de la voie de l'éthylène, le nitrate d'argent (Beyer. 1976), les plantules n'ont plus la courbure caractéristique de la crosse apicale et l'activité du promoteur *WSCP* n'est pas détectée.

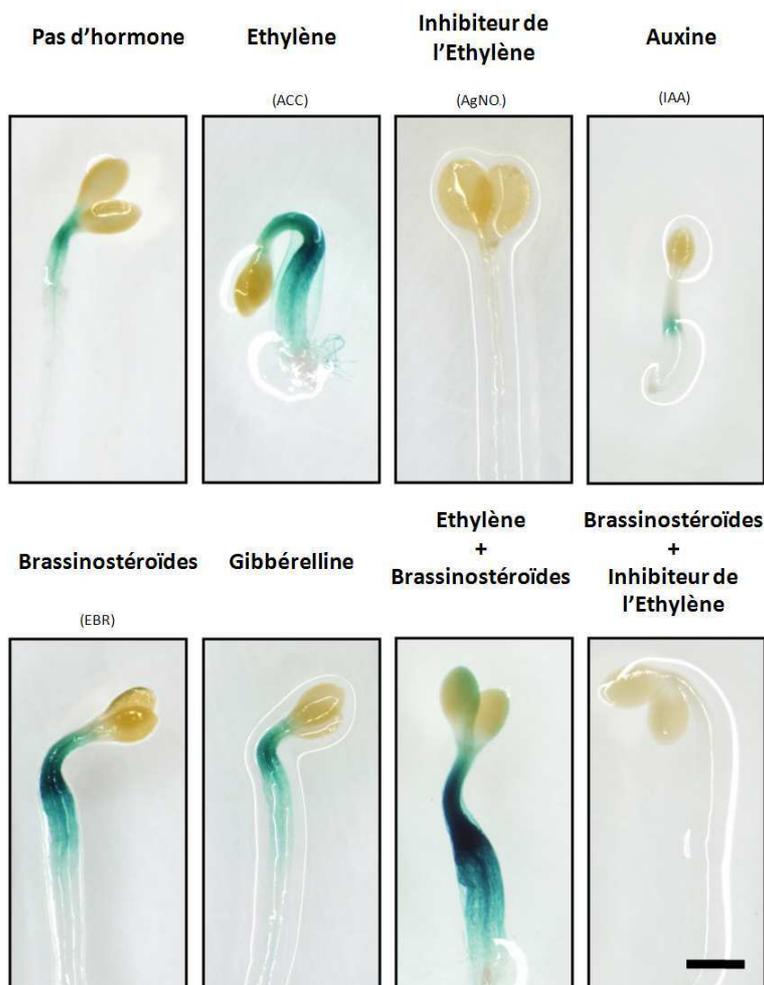


Figure 36 : Analyse de l'expression du promoteur du gène *WSCP* dans les plantules étiolées 3 jours en présence d'hormones.

Les graines sont semées sur milieu MS supplémenté en hormone et/ou inhibiteurs d'hormones. Après 2 jours à 4°C, les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. Les plantules étiolées sont colorées et photographiées. Les concentrations en hormones et inhibiteurs d'hormones sont : 10 μM ACC (précurseur directe de l'éthylène) ; 100 μM AgNO_3 (inhibiteur de l'éthylène) ; 10 μM IAA (Auxine) ; 100 nM EBR (Brassinostéroïdes) ; 10 μM Gibbérelline. Barre d'échelle : 500 μm .

L'auxine réprime l'activité du promoteur de *WSCP* contrairement à l'éthylène. Les plantules étiolées ont une forme de bouteille et le reliquat d'activité promotrice *WSCP* est situé au niveau du goulot qui doit être probablement la partie apicale de l'hypocotyle.

Les brassinostéroïdes augmentent fortement l'activité GUS dans la crosse apicale et dans la partie supérieure de l'hypocotyle. Le promoteur *WSCP* a une activité maximale dans les mêmes tissus lorsque les plantules étiolées sont en présence de brassinostéroïdes et d'éthylène. Afin de comprendre la relation entre ces deux hormones dans la régulation du promoteur *WSCP*, nous avons combiné les brassinostéroïdes et l'inhibiteur de l'éthylène. Dans ces conditions, aucune activité n'est détectée dans les plantules. L'action de l'éthylène semble donc située en aval des brassinostéroïdes dans la régulation positive du promoteur

WSCP. Ces expériences n'ont pas été faites avec un autre inhibiteur de la voie de l'éthylène comme le *trans*-Cyclooctene (Sisler *et al.* 1990).

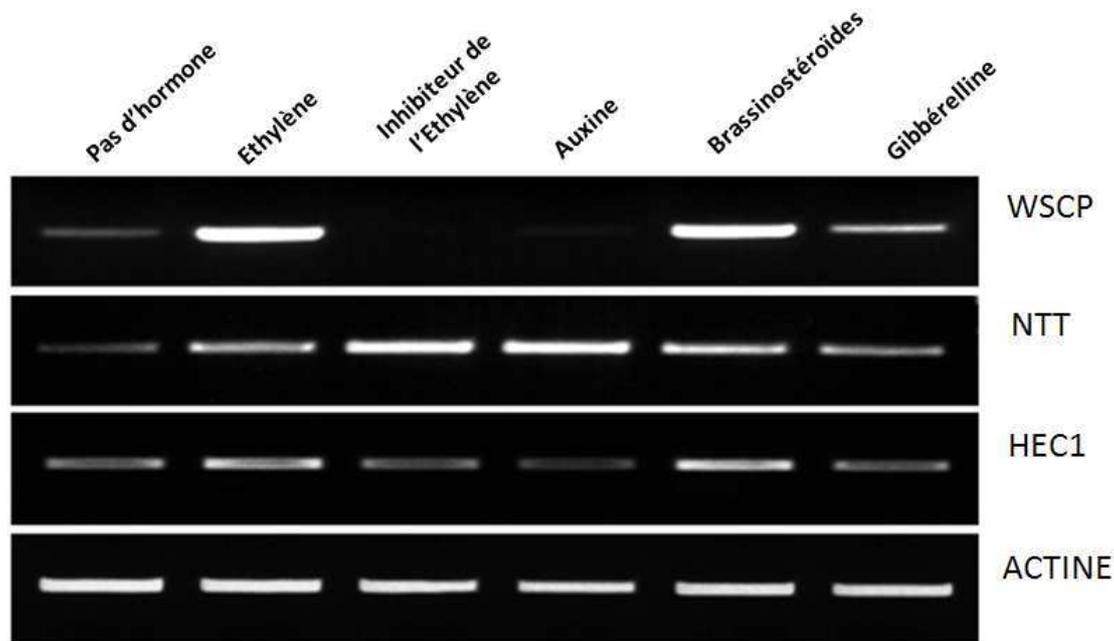


Figure 37 : Expression des gènes codant pour *WSCP* et les facteurs de transcription *NTT* et *HECATE1* chez les plantules étiolées en présence d'hormones.

Les ARNm ont été extraits à partir de plantules sauvages étiolées pendant 3 jours. Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative. Le nombre de cycle d'amplification pour chaque jeu d'amorces a été déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. L'ARN *actine* est utilisé comme gène contrôle. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%.

Nous avons ensuite comparé le niveau des transcrits *WSCP*, *NTT* et *HECATE1* dans les plantules étiolées en présence d'hormones ou d'inhibiteurs d'hormones par RT-PCR semi-quantitative (Fig. 37). Les différentes accumulations du transcrit *WSCP* vont dans le sens des observations faites avec les lignées *pWSCP::GUS* (Fig. 36). En effet, l'ARNm de *WSCP* s'accumule fortement dans les plantules étiolées en présence d'éthylène et de brassinostéroïdes. De plus, il est réprimé en présence de nitrate d'argent et d'auxine par rapport aux plantes contrôles sans hormone (Fig. 37 ligne 1). Cependant, le transcrit *WSCP* s'accumule légèrement plus avec le traitement aux gibbérellines alors que les études du promoteur *WSCP* par le gène rapporteur *GUS* n'ont pas révélé de changement significatif avec le contrôle sans hormone (Fig. 37 ligne 1 ; Fig. 36).

L'accumulation du transcrit *NTT* est maximale lorsque *WSCP* est réprimé comme par exemple en présence d'auxine et d'inhibiteur de l'éthylène (Fig. 37 ligne 2). Ces résultats sont compatibles avec un rôle de *NTT* dans la régulation négative du transcrit *WSCP*. Mais les niveaux de ces transcrits n'ont pas été déterminés par RT-PCR semi-quantitative dans le mutant *ntt* en présence de ces deux composés faute de temps.

Par ailleurs, les ARNm codant pour HEC1 sont légèrement plus représentés en présence d'éthylène et de brassinostéroïdes, hormones induisant une forte expression des transcrits *WSCP* dans les plantules étiolées (Fig. 37 ligne 1 et 3). Les analyses du promoteur *HEC1* par le gène rapporteur GUS ont également révélé une augmentation de son activité en présence de ces hormones (résultats non-montrés). Les facteurs de transcription NTT et HECATE pourraient jouer un rôle antagoniste dans la régulation du transcrit *WSCP* dans les plantules étiolées en présence d'éthylène et de brassinostéroïdes. Nous tenterons d'éclaircir cela dans la partie 3.C.

3. B La protéine *WSCP* est fortement exprimée dans la partie externe de la crosse apicale en présence d'éthylène

Précédemment, nous avons vu une augmentation de l'activité du promoteur *WSCP* et du transcrit correspondant par RT-PCR semi-quantitative dans les plantules étiolées en présence d'éthylène et de brassinostéroïdes (Fig. 36 et 37). Nous avons réalisé des expériences de western blot sur des extraits protéiques de plantules étiolées en présence de ces mêmes hormones afin de savoir si cela s'accompagne également d'une accumulation de la protéine *WSCP* (Fig. 38).

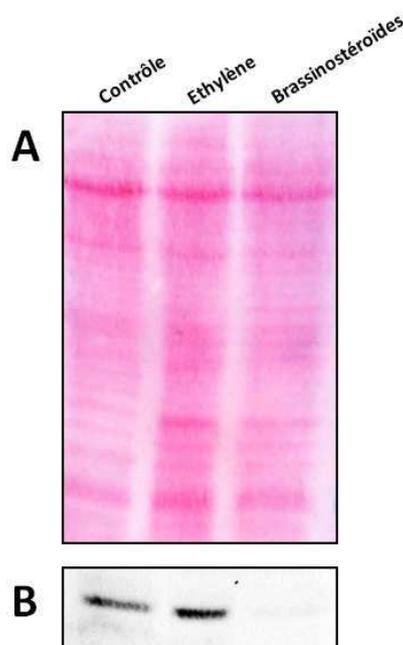


Figure 38 : Profil d'expression de la protéine *WSCP* chez les plantules étiolées 3 jours en présence d'éthylène et de brassinostéroïdes.

Les graines sont semées sur milieu MS supplémenté ou non avec 10 μ M du précurseur de l'éthylène (ACC) ou 100nM de brassinostéroïdes (EBR). Après 2 jours à 4°C, les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. 40 μ g de protéines totales sont déposées par puits. A) Profil de protéines obtenu par coloration au rouge ponceau de la membrane après transfert. B) Immunodétection de *WSCP* par un anticorps dirigé contre la protéine.

Pour une même quantité de protéines déposée sur gel (Fig. 38 A), la protéine WSCP est faiblement immunodétectée en condition normale de culture et est induite en présence d'éthylène (Fig. 38 B). Il y a une corrélation entre augmentation du transcrit *WSCP* et accumulation de la protéine correspondante en présence d'éthylène. De manière surprenante, la protéine WSCP n'est pas immunodétectée dans les plantules étiolées en présence de brassinostéroïdes (Fig. 38 B). Pourtant dans la partie 3 A, nous avons montré une accumulation dans les plantules étiolées du transcrit *WSCP* en présence de brassinostéroïdes comparable à celle obtenue avec l'éthylène (Fig. 37). Cette hormone régule positivement le transcrit *WSCP* mais empêche l'accumulation de la protéine WSCP de manière post-transcriptionnelle. Les hypothèses quant à cette surprenante régulation seront abordées dans la discussion.

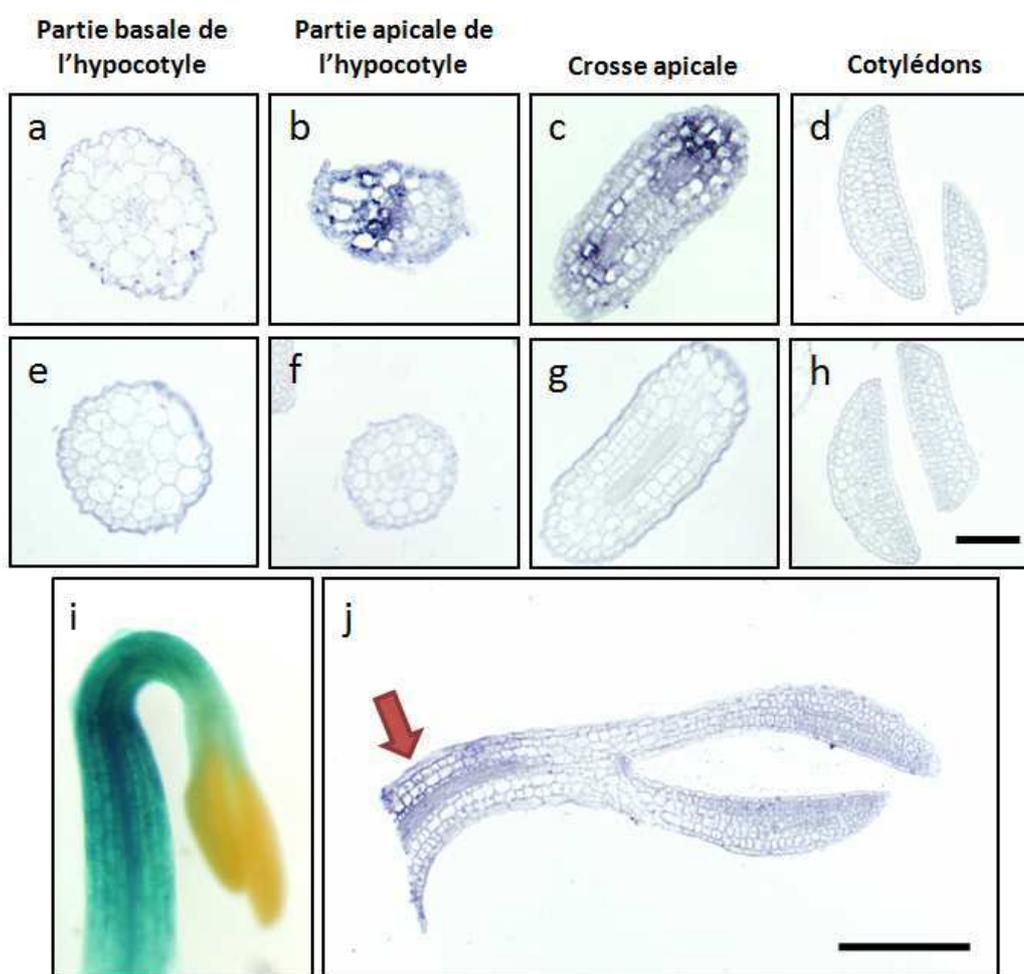


Figure 39 : Immunolocalisation de la protéine WSCP dans les plantules étiolées 3 jours en présence d'éthylène.

Les graines sont semées sur milieu MS supplémenté avec $10 \mu\text{M}$ d'ACC (Ethylène). Après 2 jours à 4°C , les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. Les plantules sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de $10 \mu\text{m}$ sont réalisées. Les coupes sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine WSCP (a-d, j) ou du sérum pré-immun (e-h). Analyse de l'expression du promoteur du gène *WSCP* dans la crosse apicale des plantules *pWSCP::GUS* en présence d'éthylène (i). Barre d'échelle : $100 \mu\text{m}$.

Nous avons ensuite réalisé des immunolocalisations de la protéine WSCP sur des coupes de plantules étiolées 3 jours en présence du précurseur de l'éthylène. Nous avons réutilisé le protocole expérimental mis au point pour les immunolocalisations dans la fleur. Cette technique va nous permettre de savoir précisément dans quel tissu la protéine WSCP est exprimée. Le sérum préimmun ne donne aucun signal dans tous les tissus testés (Fig. 39 e-h). Par ailleurs, aucune protéine n'est immunodétectée dans les cotylédons, les parties centrales et basales de l'hypocotyle (Fig. 39 a et d). L'activité GUS est prononcée dans les tissus conducteurs et elle est homogène dans les autres couches cellulaires de la crosse apicale des plantules étiolées en présence d'éthylène (Fig. 39 i). Par contre, la protéine WSCP est immunodétectée dans la partie convexe de la crosse apicale et de l'hypocotyle dans les cellules du cortex et de l'endoderme uniquement (Fig. 39 b, c et j). Une régulation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle de WSCP doit probablement se dérouler dans le protoxylème, le protophloème et les autres tissus situés dans la partie concave de la crosse apicale et de l'hypocotyle en présence d'éthylène.

3. C NTT et HEC1 régulent le gène *WSCP* au niveau traductionnel ou post-traductionnel en présence de l'hormone éthylène

Nous avons remarqué une augmentation du transcrit et de la protéine WSCP en présence d'éthylène (Fig. 37 et 38). Les facteurs de transcription NTT et HECATE1 régulent le transcrit *WSCP* dans les plantules étiolées (Fig. 34) mais qu'en est-il en présence d'éthylène ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons extrait dans un premier temps les ARNm des plantules étiolées sauvages et mutantes en absence ou en présence d'éthylène. Les différents niveaux de transcrits ont été analysés par RT-PCR semi-quantitative avec l'actine comme contrôle (Fig. 40 A). Les résultats sont également présentés sous forme d'histogramme (Fig. 40 B). La taille et l'intensité de chaque bande ont été déterminées par bioinformatique (<http://www.lukemiller.org/journal/2007/08/quantifying-western-blot-without.html>).

La régulation du transcrit *WSCP* par les facteurs de transcription NTT et HEC1 est à nouveau confirmée dans les plantules étiolées en absence d'hormones. En effet, le mutant *ntt* présente une accumulation et le mutant *hec1* une absence de transcrit *WSCP* par rapport au

sauvage (Fig. 40 A contrôle). En présence d'éthylène, le transcrite *WSCP* s'accumule dans les plantules étiolées sauvages et mutantes *hec1* à un niveau relativement similaire (Fig. 40 B). Par contre, le transcrite d'intérêt s'accumule davantage chez le mutant *ntt* que chez le sauvage dans les mêmes conditions. Le facteur de transcription NTT réprime le niveau de transcrits *WSCP* dans les plantules étiolées en présence d'éthylène. Cependant, le facteur HEC1 ne semble pas impliqué dans l'augmentation du transcrite d'intérêt en présence de cette même hormone.

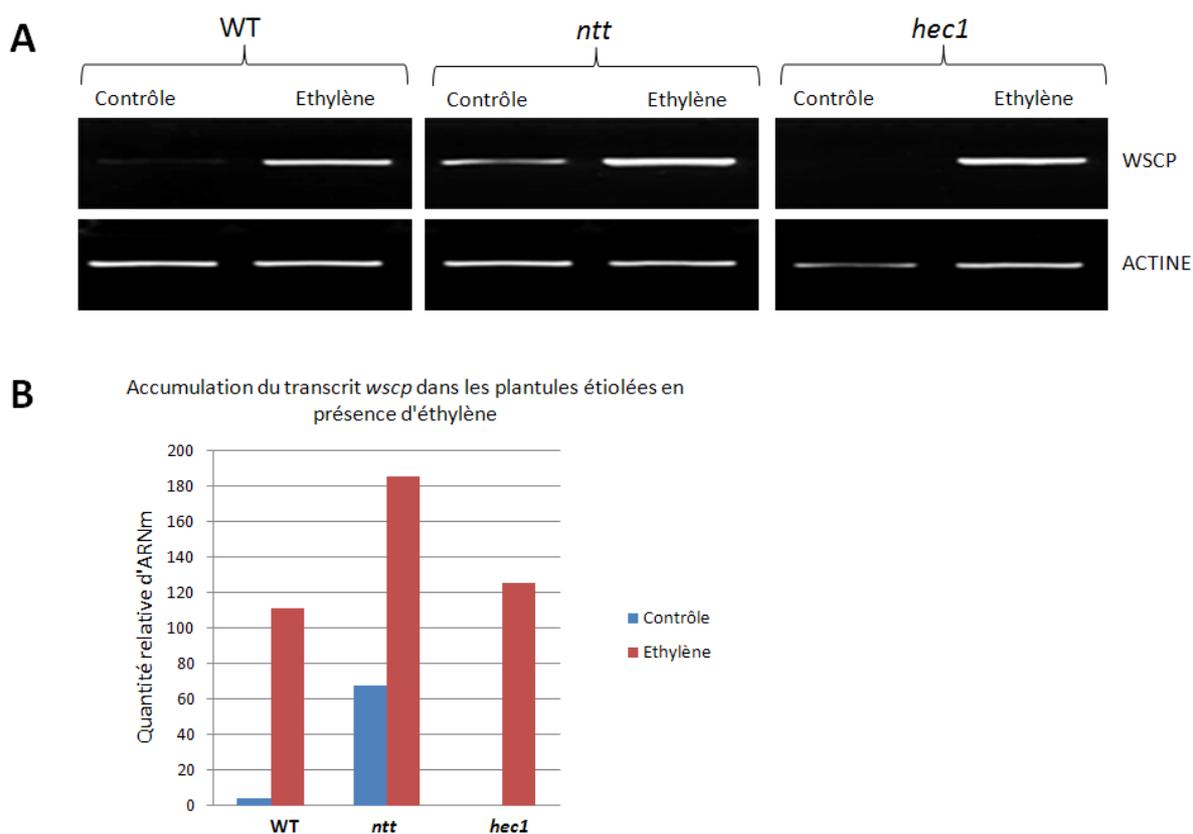


Figure 40 : Expression de *WSCP* chez des plantules *ntt* et *hecate1* étiolées cultivées en présence d'éthylène

A) Les ARNm ont été extraits à partir de plantules étiolées 3 jours du sauvage (WT), des mutants *ntt* (Crawford *et al.* 2007) et *hec1*. Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative. Le nombre de cycles d'amplification pour chaque jeu d'amorces a été déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. L'ARN *actine* est utilisé comme gène contrôle. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%.

B) Les résultats de RT-PCR semi-quantitative en (A) ont été représentés sous forme d'histogramme. La taille et l'intensité de chaque bande ont été déterminées par bioinformatique avec le logiciel Photoshop CS3 en utilisant le protocole à l'adresse suivante : <http://www.lukemiller.org/journal/2007/08/quantifying-western-blot-without.html>. Chaque valeur obtenue avec les amorces *WSCP* a été rapportée à la valeur contrôle obtenue avec les amorces *ACTINE*.

Nous avons ensuite testé l'influence de ces facteurs de transcription sur le niveau de la protéine *WSCP* dans les plantules étiolées en présence d'éthylène. Les protéines ont été extraites des plantules sauvages et mutantes *wscp-Salk*, *hec1*, *hec1 hec3* et *35S::HEC1* puis analysées par western blot (Fig. 41). Les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et colorées au rouge Ponceau (Fig. 41 A). Les

quantités de protéines transférées semblent proches mais il est à noter que dans le puits correspondant au mutant *hec1 hec3*, le profil de protéines est différent des 5 autres lignées notamment entre 10 et 30 kDa.

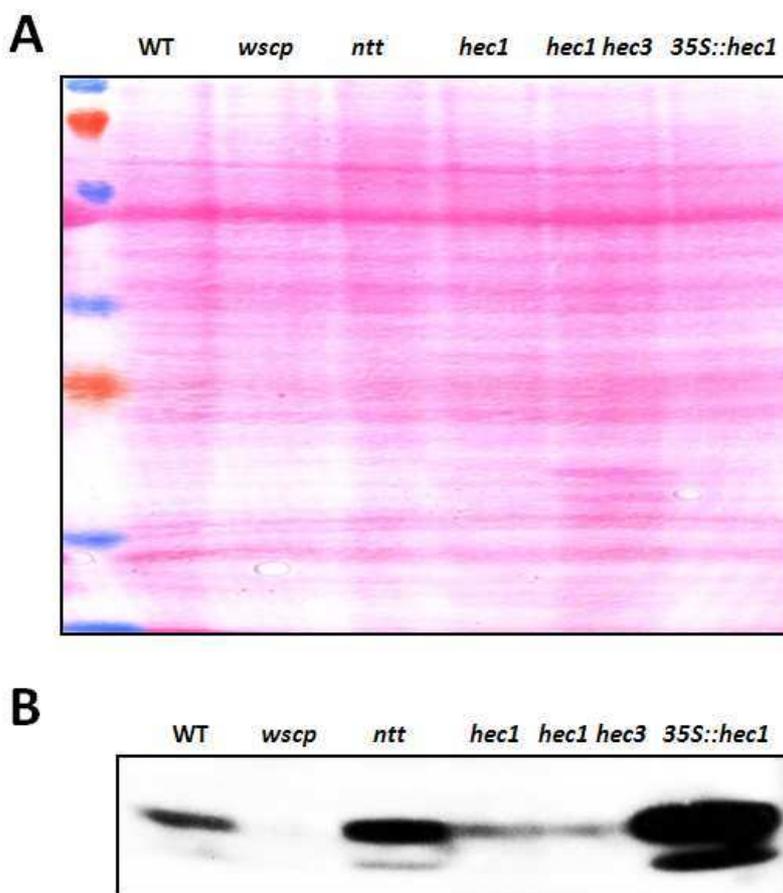


Figure 41 : Accumulation de WSCP dans les plantules étiolées des mutants pour les facteurs de transcription NTT et HECATE en présence d'éthylène.

Les graines du sauvage (WT), des mutants *wscp-Salk* (*wscp*), *ntt* (Crawford *et al.* 2007), *hec1*, *hec1 hec3* et du surexprimeur *35S::HEC1* (Gremski *et al.* 2007) ont été utilisées pour l'expérience de western blot. Les graines sont semées sur milieu MS supplémenté avec 10 μ M d'ACC (Éthylène). Après 2 jours à 4°C, les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. 40 μ g de protéines totales sont déposées par puits. A) Profil de protéines obtenu par coloration au rouge ponceau de la membrane après transfert. B) Immunodétection de WSCP par un anticorps dirigé contre la protéine.

Dans la figure 41 B, la protéine WSCP s'accumule davantage chez le mutant *ntt* en comparaison avec le sauvage. Cela pourrait être une conséquence directe de l'augmentation du transcrit *WSCP* observée chez ce mutant (Fig. 40 A et B). Toutefois, WSCP est très faiblement immunodéctée dans les mutants *hec1* et *hec1 hec3* par rapport au sauvage. Par ailleurs, une surexpression de la protéine HEC1 induit une très importante accumulation de WSCP. Ce facteur de transcription joue un rôle dans le niveau de transcrit *WSCP* en absence d'hormones (Fig. 34 et 40) et probablement dans la traduction et/ou la stabilité de la protéine WSCP en présence d'éthylène (Fig. 41).

3. D Le mutant *wscp-Salk* ne présente pas de phénotype en présence d'éthylène

Les plantules sauvages et mutantes *wscp-Salk* ne présentent pas de phénotype à l'obscurité dans les conditions testées (Fig. 32). Précédemment, nous avons vu une accumulation de la protéine WSCP au niveau des tissus de la partie convexe de la crosse apicale des plantules étiolées en présence d'éthylène (Fig. 39). Nous avons étudié le phénotype du sauvage et du mutant car du fait de sa localisation, la protéine WSCP pourrait être impliquée dans la formation de la crosse apicale et dans la croissance de l'hypocotyle.

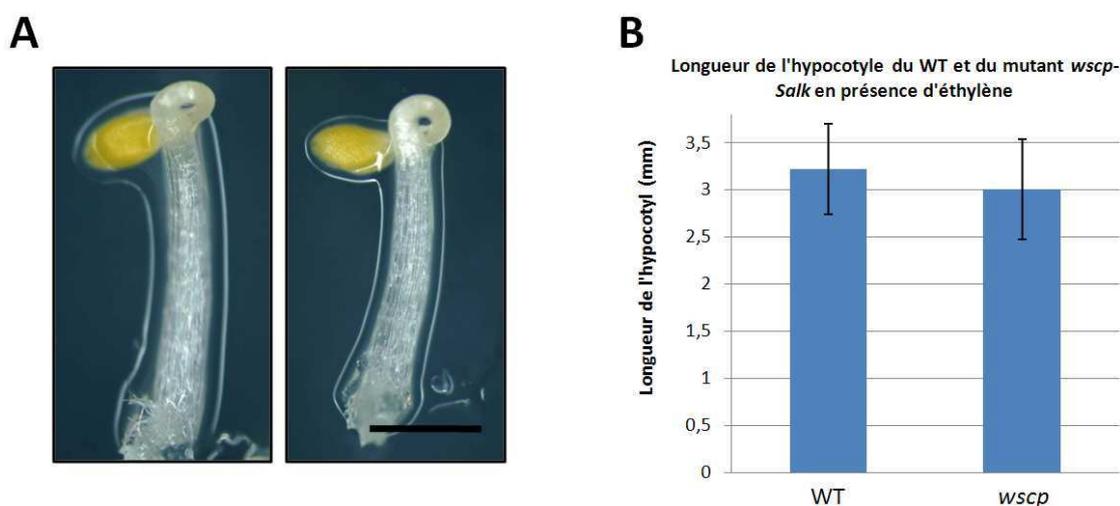


Figure 42 : Phénotype des plantules mutantes *wscp-Salk* à l'obscurité en présence d'éthylène.

Les graines du sauvage (WT) et du mutant *wscp-Salk* (*wscp*) sont semées sur milieu MS supplémenté avec 10 μ M d'ACC (Éthylène). Après 2 jours à 4°C, les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. Les plantules sont photographiées (A) et la longueur de l'hypocotyle mesurée (B ; n=40). Barre d'échelle : 1 mm.

Les plantules sauvages et *wscp-Salk* présentent toutes deux le phénotype caractéristique de la triple réponse (Fig. 42 A). Les plantules mutantes ont également la crosse apicale qui forme une boucle caractéristique en présence de cette hormone (Fig. 43 gauche). Par ailleurs, la longueur de l'hypocotyle des deux lignées ne présente pas de différences significatives (Fig. 42 B ; test t de Student ; $p > 0,1$). Les hypocotyles mesurent en moyenne 3 mm après 3 jours d'obscurité en présence d'éthylène contre 6,5 mm sans hormone (Fig. 32 C et 42 B).

4 WSCP est régulée négativement à la lumière

Comme nous l'avons mentionné précédemment, deux protéines à domaine Kunitz ont été localisées dans la crosse apicale et l'hypocotyle des plantules étiolées de pois-chiche

(*Cicer arietinum* ; Jiménez *et al.* 2007). L'une d'entre elles, CaTPI a été décrite comme étant régulée négativement lors de l'exposition de plantules à la lumière. Nous avons souhaité savoir si cette régulation existe également pour la protéine WSCP d'*Arabidopsis* et à quel niveau cette régulation s'effectue.

4. A Analyse des transcrits et de la quantité de protéines WSCP au cours du dé-étiolement

Les plantules sont laissées 3 jours à l'obscurité puis exposées 3, 6, 9 ou 24 h à la lumière. Les ARNm et les protéines sont extraits des échantillons pour réaliser des RT-PCR semi-quantitatives et de western blot (Fig. 43 A et B).

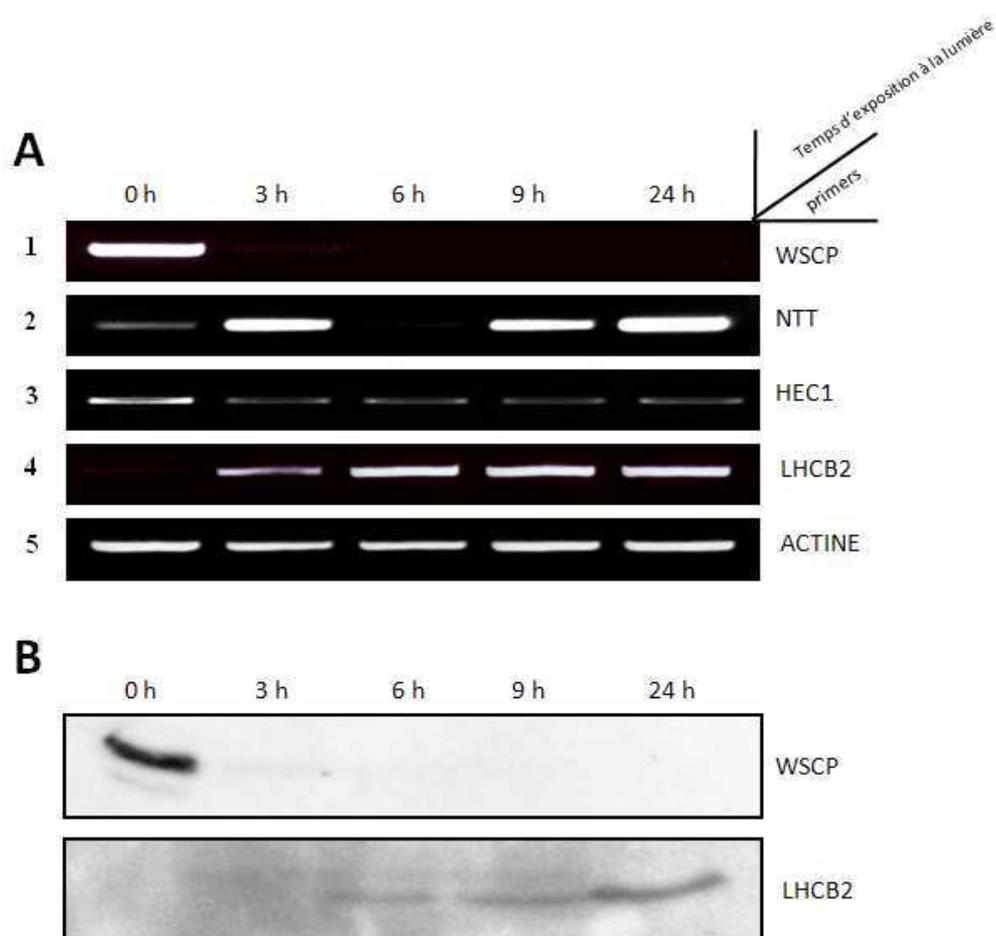


Figure 43 : Régulation du gène *wscp* au cours du dé-étiolement

Les graines du sauvage sont semées sur milieu MS et les boîtes sont placées à 4°C pendant 2 jours. Les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. Les plantules étioilées sont exposées 0, 3, 6, 9 ou 24 h à la lumière ensuite les protéines et les ARNm sont extraits.

A) Expression des gènes codant pour WSCP et les facteurs de transcription NTT et HECATE chez les plantules sauvages au cours du dé-étiolement. Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative. Le nombre de cycle d'amplification pour chaque jeu d'amorces a été déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. L'ARN *ACTINE* et *LHCB2* sont utilisés comme gènes contrôles. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%.

B) Immunodétection des protéines WSCP et LHCB2 par l'utilisation de leur anticorps respectif. La protéine LHCB2 est décrite dans la littérature pour être induite lors de l'exposition des plantules étioilées à la lumière.

Dans la Figure 43 A, les ARNm codant pour WSCP sont très rapidement réprimés lors de l'exposition des plantules à la lumière. Après seulement 3 h, le transcrit est faiblement détecté par RT-PCR semi-quantitative (ligne 1). En plus du transcrit de l'actine qui est utilisé comme contrôle positif, nous avons également inclus dans notre étude l'analyse du transcrit *LHC2B* dont l'expression augmente à la lumière. LHC2B est une protéine majeure du photosystème II. Le transcrit correspondant est présent à partir de 3 h d'exposition à la lumière (Fig. 43 A ; ligne 4). Il y a une corrélation entre la répression de *WSCP* et le début de la transcription de *LHC2B* impliqué dans la photomorphogénèse.

De la même manière, le transcrit *HEC1* est également réprimé à la lumière mais contrairement au transcrit *WSCP*, celui-ci est toujours présent entre 6 et 24 h d'exposition à la lumière (Fig. 43 A ; ligne 3). L'ARNm du gène *NTT* a un profil d'accumulation atypique. Il s'accumule les premières heures de l'exposition à la lumière puis aucun transcrit n'est détecté après 6 h. Les transcrits s'accumulent à nouveau après 9 et 24 h à la lumière (Fig. 43 A ; ligne 2). Le gène *WSCP* est régulé négativement par le facteur de transcription NTT et positivement par HEC1 à l'obscurité (Fig. 34 et 40). Lors du dé-étiolement, nous venons observer une augmentation de répresseur NTT et une diminution de l'activateur HEC1 dès 3 h d'exposition à la lumière par RT-PCR semi-quantitative (Fig. 43). La régulation de ces deux facteurs de transcription va dans le sens d'un arrêt de l'expression de *WSCP*.

Dans la figure 43 B, la protéine *WSCP* n'est plus immunodétectée après 3 h d'exposition à la lumière des plantules étioilées. La protéine LHC2B est présente dans les plantules à partir de 6 h d'exposition à la lumière puis elle s'accumule progressivement pendant les premières 24 h. En moins de 3h, les transcrits *WSCP* sont réprimés et le pool de protéines *WSCP* présentes à t_0 , rapidement dégradé.

4. B *WSCP* ne semble pas jouer un rôle lors du dé-étiolement

A l'obscurité, les étioplastés possèdent une structure paracrystalline nommée corps prolamellaire qui est composé, entre autres, de précurseurs de la chlorophylle interagissant avec les enzymes POR (*NADPH-Protochlorophyllide oxydoreductase* ; Dehesh et Ryberg, 1985). Ces protéines ont la particularité d'être actives uniquement à la lumière en transformant le précurseur de la chlorophylle, la protochlorophyllide, en chlorophyllide

(Reinbothe *et al.* 1996). Une grande quantité de chlorophyllide est synthétisée peu de temps après une exposition à la lumière.

Une protéine de la famille des WSCP est impliquée, chez l'orge, dans le stockage transitoire des précurseurs de la chlorophylle au cours du dé-étiolement (Reinbothe *et al.* 2004 b). WSCP pourrait en quelque sorte séquestrer de manière transitoire les différents pigments chlorophylliens avant la mise en place des appareils photosynthétiques évitant ainsi des stress oxydatifs. En effet, les pigments chlorophylliens libres peuvent transmettre leur énergie d'excitation à leur environnement et générer des molécules très réactives comme l'oxygène singulet aux effets délétères pour l'intégrité des cellules (Apel et Hirt. 2004).

La protéine WSCP d'*Arabidopsis* est exprimée dans les plantules étioilées au niveau de la crosse apicale (Fig. 31 et 39). Cette région va devenir photosynthétique au cours du dé-étiolement tout comme les cotylédons. Par ailleurs, cette même protéine est capable de fixer la chlorophylle *in vitro* et de former des agrégats (Fig. 5). WSCP d'*Arabidopsis* pourrait donc *a priori* être impliquée dans le stockage transitoire de la chlorophylle ou de ses précurseurs au cours du dé-étiolement de par sa localisation *in planta* et ses propriétés biochimiques décrites précédemment. Cette implication potentielle a été testée en recherchant chez le mutant *wscp-Salk* un éventuel phénotype

Comportement du mutant *wscp-Salk* lors du dé-étiolement

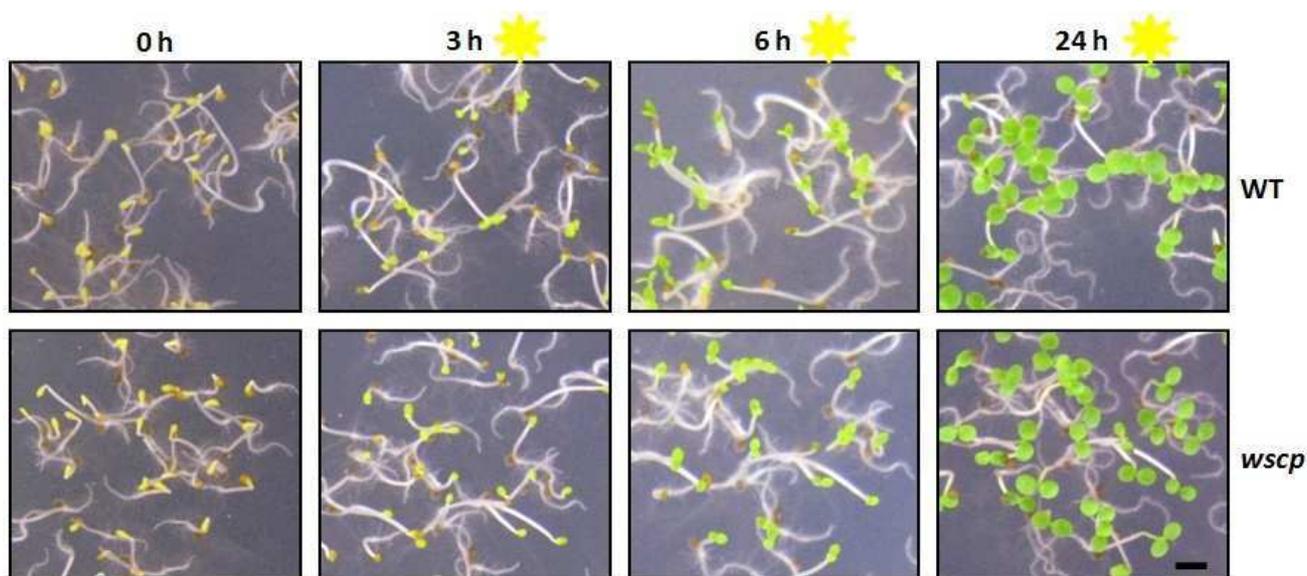


Figure 44 : Phénotype des plantules mutantes *wscp-Salk* au cours du dé-étiolement

Les graines du sauvage (Partie supérieure) et du mutant *wscp-Salk* (Partie inférieure) sont semées sur milieu MS et les boîtes sont placées à 4°C pendant 2 jours. Les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. Les plantules étioilées sont photographiées après 0, 3, 6 ou 24 h d'exposition à la lumière. Barre d'échelle : 2mm.

La protéine WSCP ne semble pas jouer de rôle dans la formation de la crosse apicale et l'élongation de l'hypocotyle (Fig. 32). Nous avons testé l'hypothèse d'une implication de WSCP lors du verdissement et de l'ouverture des cotylédons au cours du passage des plantules étiolées à la lumière.

Les plantules sauvages et mutantes *wscp-Salk* sont laissées à l'obscurité 3 jours puis exposées à la lumière 3, 6 ou 24 h en lumière continue (Fig. 44). Après 3 h d'exposition à la lumière, les plantules commencent à verdir et leur crosse apicale n'est plus visible. Les cotylédons des plantules commencent à s'ouvrir après 6 h à la lumière. En un jour, les plantules des deux lignées ont leurs cotylédons parfaitement fonctionnels : ouverts, photosynthétiques et développés. Le mutant *wscp-Salk* ne présente donc aucun phénotype majeur lors du dé-étiolement.

Test de photoblanchiment

Les plantules sont étiolées 3 jours à l'obscurité puis exposées sous une lumière de forte intensité (cf. matériels et méthodes). Le mutant *Salk oep16* impliqué dans l'import de PORA photoblanchit dans ces conditions (Pollmann *et al.* 2007). En effet, la protéine PORA n'est pas présente à l'obscurité dans les étiooplastes du mutant *oep16* et celle-ci ne peut pas jouer son rôle photoprotecteur en interagissant avec les pigments chlorophylliens au cours du dé-étiolement (Pollmann *et al.* 2007 ; Buhr *et al.* 2008). Ce mutant est incapable de pallier au stress photooxydatif et très rapidement les plantules ne sont plus viables. Les plantules photoblanchissent au niveau des cotylédons.

Le mutant *oep16* a donc été utilisé comme témoin positif de nos expériences. Dans les conditions testées, le mutant *wscp-Salk* ne photoblanchit pas mais il verdit comme la sauvage, contrairement au mutant *oep16* (résultats non montrés).

5 WSCP est une protéine de stress exprimée pendant la skotomorphogénèse ?

5. A Le promoteur du gène WSCP est actif lors de stress mécanique

Les protéines WSCP sont considérées comme des protéines de stress chez de nombreuses espèces de plantes durant la photomorphogénèse (Satoh *et al.* 2001). Deux

protéines ont été récemment caractérisées, comme nous l'avons déjà mentionné, dans la crosse apicale et les régions en croissance de l'hypocotyle de pois-chiche (Jiménez *et al.* 2007 ; Jiménez *et al.* 2008). L'une d'entre-elle, CaTPI-1, est induite lors de blessures. Nous avons effectué les mêmes expériences sur des plantules étiolées d'*Arabidopsis*. Les mutants *pWSCP::GUS* étiolés sont blessés par coupure ou écrasement à l'obscurité sous une lumière verte (dans ces conditions les mutants restent étiolés). Les plantules sont ensuite colorées et photographiées (Fig. 45).

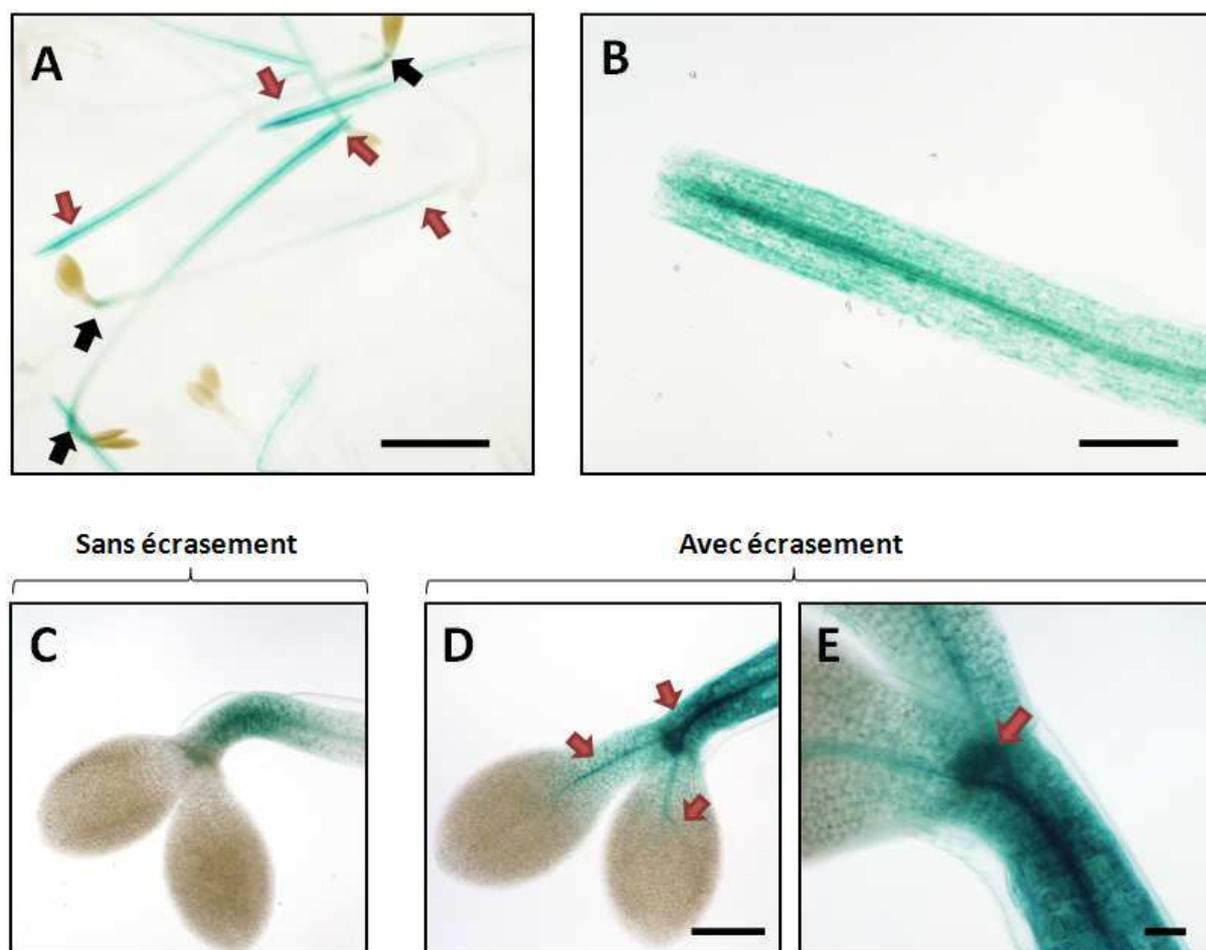


Figure 45 : Analyse de l'expression du promoteur du gène *WSCP* dans les plantules étiolées suite à une coupure ou un écrasement.

Les graines sont semées sur milieu MS et les boîtes sont placées à 4°C pendant 2 jours. Les boîtes sont exposées 3 h à la lumière puis à l'obscurité pendant 3 jours. Les plantules étiolées sont coupées en deux au niveau de l'hypocotyle (A et B) ou écrasées au niveau de la crosse apicale (C-E) à l'obscurité et sous lumière verte (afin de ne pas déclencher le dé-étiollement). Après 24 h, les plantules sont colorées et photographiées. Barre d'échelle : 1 mm pour A ; 250 µm pour B ; 200 µm pour C et D ; 50 µm pour E.

Les plantules *pWSCP::GUS* expriment toutes une activité GUS au niveau des coupures réalisées dans l'hypocotyle (Fig. 45 A ; Flèches rouges). La coloration GUS est conservée dans la crosse apicale et son intensité est comparable au contrôle sans stress (Fig.

45 A et C ; Flèches noires). Dans la figure 45 B, le promoteur WSCP est principalement actif à proximité des tissus conducteurs sur une longueur d'environ 1 mm après la coupure. L'écrasement de la crosse apicale induit également une activité GUS dans le méristème apical caulinaire et dans les tissus conducteurs des cotylédons (Fig. 45 C-E). Nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'effectuer des expériences complémentaires pour confirmer d'une autre manière les résultats observés.

5. B WSCP pourrait être impliquée dans le processus d'émergence des plantules hors du substrat

Les plantules étiolées progressent à travers le substrat grâce à une élongation de l'hypocotyle ; la crosse apicale protège les cotylédons et le méristème apical caulinaire. Les plantules finissent par atteindre la surface, c'est l'émergence. Pendant leur progression, les plantules pourraient subir des contraintes mécaniques au niveau de la partie convexe de la crosse apicale véritable « foret » au cours de la progression dans le sol. Nous avons vu que les contraintes mécaniques augmentent l'activité du promoteur WSCP dans ce tissu (Fig. 45 D et E). Par ailleurs, celles-ci sont décrites dans la littérature pour faire intervenir, entre autres, l'éthylène (Woest *et al.* 1999). Cette hormone, lorsqu'elle est ajoutée de manière exogène, induit l'expression de la protéine WSCP dans la partie convexe de la crosse apicale. Nous avons testé l'hypothèse d'une implication de WSCP dans le processus fondamental qu'est l'émergence.

Les graines sont disposées au fond d'une boîte de Pétri puis recouvertes d'un volume constant de milieu MS de différentes concentrations en agar. Après 2 jours à 4°C, les graines sont exposées 3 h à la lumière puis placées à l'obscurité pendant 3 jours avant comptage. Une plantule est considérée comme émergée si elle affleure au moins de la surface du substrat gélosé (Fig. 46 A). Environ 80 % des plantules étiolées émergent du substrat contenant 8 g/L d'agar. Ce pourcentage diminue lorsque la concentration en agar du milieu augmente. Il n'y a plus que 69 % de plantules sauvages émergées pour une concentration en agar deux fois plus importante et 25 % pour une concentration de 24 g/L d'agar dans le milieu. Pour le mutant *wscp-Salk*, le pourcentage d'émergence est comparable à celui du sauvage pour une concentration d'agar de 8 g/L. Par contre, dès que le pourcentage d'agar augmente, le taux d'émergence des plantules mutantes devient 1,6 à 2,5 inférieur à celui du sauvage. Ces expériences doivent être reproduites maintenant en ajoutant le mutant *wscp-Salk* complé

et éventuellement le mutant *hec1* qui présente un défaut d'accumulation de WSCP dans certaines conditions. Elles suggèrent néanmoins que WSCP puisse jouer un rôle dans les propriétés mécaniques de la crosse apicale.

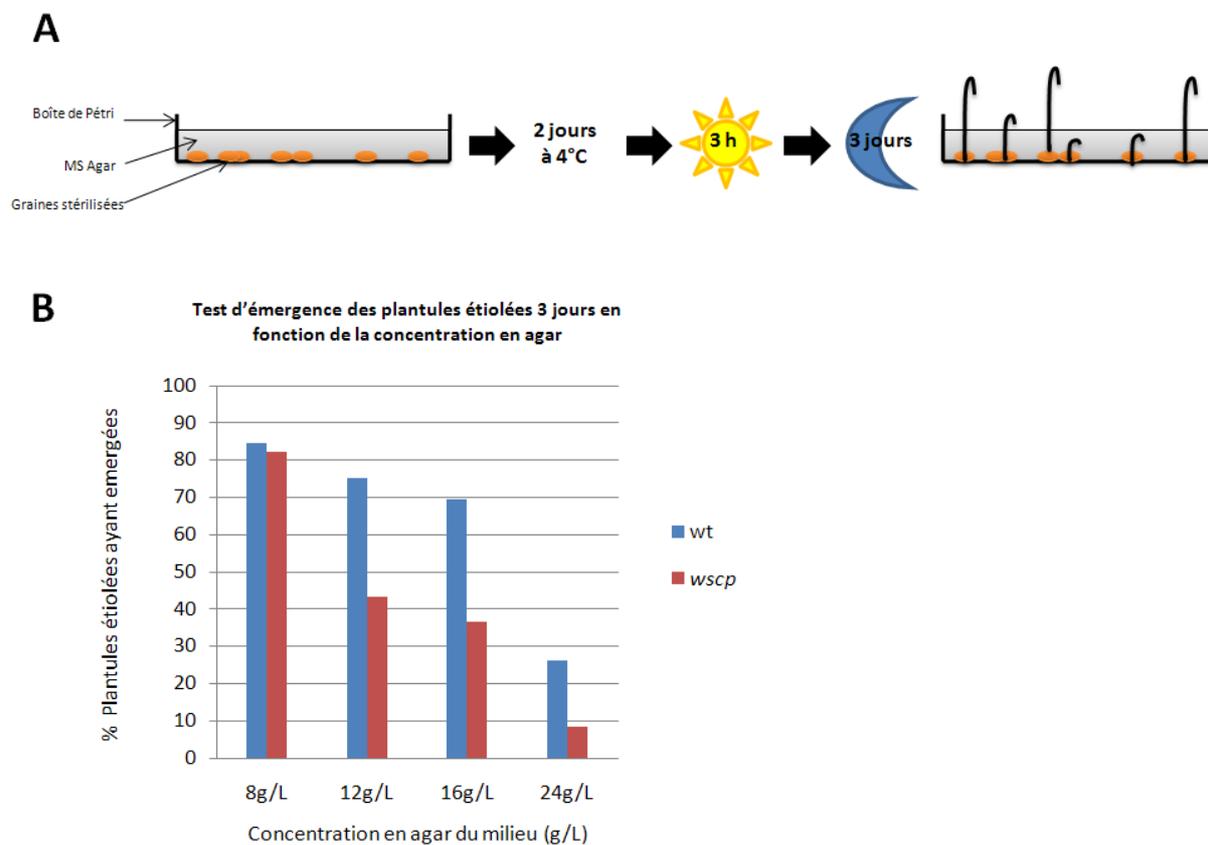


Figure 46 : Test d'émergence des plantules sauvages et du mutant *wscp-Salk*

A) Principe de l'expérience. Les graines sont disposées dans une boîte de Pétri et recouvertes d'agar (8, 12, 16, 24 g/L). Les graines sont recouvertes par 22 mm de MS agar après solidification. Les boîtes sont ensuite placées 2 jours à 4°C puis 3 H à la lumière et 3 jours à l'obscurité. Les plantules sont considérées comme ayant émergées dès leur affleurement du milieu gélosé.

B) Test d'émergence des plantules étiolées sauvages et mutantes *wscp-Salk* en fonction de la concentration en agar (n=50 pour les deux lignées et pour chaque concentration en agar).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

PARTIE I: Caractéristiques biochimiques de WSCP d'*Arabidopsis thaliana*

Identification du gène At1g72290 codant pour une protéine appartenant à la famille des WSCP chez *Arabidopsis*

Notre laboratoire a publié deux articles portant sur le rôle d'une protéine WSCP au cours du dé-étiolement chez l'orge (Reinbothe *et al.* 2004 a ; Reinbothe *et al.* 2004 b). Afin de poursuivre nos investigations, nous nous sommes intéressés à la fonction de cette classe de protéines chez la plante modèle *Arabidopsis*.

Nos travaux ont commencé par l'identification bioinformatique d'un homologue des protéines WSCP chez *Arabidopsis*. Le gène At1g72290 présente le plus d'homologies de séquences avec les gènes codant pour cette classe de protéines (Tab. 6). Il s'avère que la protéine codée par At1g72290 possède toutes les caractéristiques connues des WSCP avec notamment un domaine Kunitz conservé en position N-terminale (Fig. 2). Comme leur nom l'indique, les protéines WSCP (*Water-soluble Chlorophyll binding proteins*) sont capables d'interagir avec la chlorophylle. Des études récentes de diffraction aux rayons X ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle de WSCP associée à la chlorophylle chez *Lepidium*. Ces protéines s'associent en homotétramère et chacune d'elles interagit avec une molécule de chlorophylle *via* trois acides aminés essentiels (Fig. 3 A et B, proline 36 et les tryptophanes 90 et 154 ; Horigome *et al.* 2007). Ces derniers sont retrouvés uniquement dans la séquence codante du gène At1g72290 avec également le domaine LHCII des protéines du photosystème II (Fig. 2 ; Green et Kühlbrant. 1995). Nous avons pu prédire la structure tridimensionnelle de la protéine codée par At1g72290 à partir des données cristallographiques de WSCP de *Lepidium* en utilisant le programme Swiss-pdb viewer v3.7 (Guex et Peitsch. 1997). Dans le modèle obtenu, organisation des structures secondaires est conservée ainsi que la position exacte des trois acides aminés essentiels à la fixation de la chlorophylle. Toutefois, le tryptophane en position 87 présente une orientation de sa chaîne latérale différente (Fig. 3 B et C). Suite à nos analyses, nous avons conclu que la protéine codée par At1g72290 appartenait bien à la famille des WSCP. Nous avons donc décidé de la nommer WSCP par la suite.

WSCP forme des multimères en présence de chlorophylle et de thylacoïdes

La séquence codante de WSCP a été clonée sans sa séquence d'adressage dans un vecteur d'expression procaryote. Les protéines recombinantes sont fortement exprimées chez *E. coli* mais toujours sous forme de corps d'inclusion insolubles et ce, malgré les différentes conditions de culture testées. Pour les expériences de multimérisation, nous avons opté pour une approche consistant à diluer les protéines présentes dans une solution dénaturante. La concentration en agent dénaturant devient alors négligeable et une partie des protéines recombinantes se replie correctement et est fonctionnelle. Les tentatives de renaturations des protéines recombinantes sur colonne se sont avérées infructueuses (FPLC prêtée gracieusement par Silva Lerbs-Mache).

Les protéines WSCP recombinantes forment des multimères en présence de chlorophylle solubilisée dans du butanol, comme en présence de thylacoïdes purifiés (Fig. 5). Il y a de fortes probabilités pour que ces multimères soient des homotétramères au vu des expériences préliminaires obtenues en gel natif. Après séparation des multimères et des monomères sur un gradient de gel natif, le nombre de sous unités pourra être confirmé. WSCP est donc capable de former des multimères en présence de chlorophylle seule, indépendamment de la présence d'un autre partenaire, mais elle peut aussi en former en présence de thylacoïdes probablement en interagissant avec la chlorophylle. En effet, Satoh et collaborateurs ont également montré la capacité de WSCP de *Brassica oleracea* à former des multimères en retirant la chlorophylle liée aux protéines thylacoïdiennes (1998).

WSCP n'inhibe pas les protéases à sérine *in vitro*

Les inhibiteurs de protéases à domaine Kunitz sont classés en trois groupes selon leur capacité à inhiber la trypsine, la chymotrypsine et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). t-PA est une enzyme protéolytique initiant la fibrolyse (processus physiologique de dissolution des caillots sanguins). Le groupe *a* est plus ou moins spécifique de la chymotrypsine et inhibe faiblement la trypsine ou le t-PA. Le groupe *b* est plus spécifique de la trypsine que de la chymotrypsine et il n'inhibe pas le t-PA. Enfin, le groupe *c* inhibe les trois protéases à sérine (Song et Suh. 1998). Jusqu'en 2008, les tentatives de démonstration de l'activité anti-protéolytique des protéines WSCP sur la trypsine et la chymotrypsine *in vitro* ont échoué (Ilami *et al.* 1997 ; Nishio et Satoh. 1997). Récemment, une protéine de 19 kDa a été décrite comme étant très fortement exprimée en présence de l'hormone méthyl-jasmonate

chez le colza (*Brassica napus*). La protéine a été identifiée par spectrométrie de masse, il s'agit de la protéine BnD22 appartenant à la famille des WSCP. Après séparation des protéines sur gel en 2D, les spots correspondants à BnD22 sont capables d'inhiber la trypsine (Desclos *et al.* 2008).

Nous avons opté pour le même type d'approche pour tenter de caractériser une activité anti-protéolytique des protéines WSCP recombinantes. Cette technique de zymographie réverse n'a pas montré d'inhibition de trypsine et de la chymotrypsine par WSCP dans les conditions testées (Fig. 7). Nous avons également réalisé cette expérience sur des extraits protéiques de feuilles et de fleurs (où la protéine WSCP est exprimée) sans observer une différence dans le patron d'inhibition des protéases à sérine (résultats non montrés). Par ailleurs, WSCP ne modifie pas l'activité enzymatique de la trypsine *in vitro* même au ratio élevé de 10:1 (Fig. 6).

La protéine WSCP d'*Arabidopsis* n'inhibe donc pas les protéases à sérine dans les conditions testées. Des cofacteurs ou des modifications post-traductionnelles sont peut-être nécessaires à l'activité d'inhibition des protéases. Ces mêmes tests peuvent être envisagés avec une protéine recombinante tronquée à son extrémité C-terminale. En effet, les protéines WSCP sont connues comme d'autres protéines à domaines Kunitz pour être clivées à cette extrémité (Ilami *et al.* 1997 ; Satoh *et al.* 1998 ; Horigome *et al.* 2007). Ces modifications post-traductionnelles ont été décrites dans la littérature comme pouvant modifier les propriétés anti-protéolytiques des protéines à domaine Kunitz (Momonoki *et al.* 2002). Cependant, comme nous venons de le mentionner, les zymographies réverses sur des extraits totaux de fleurs n'ont pas présenté d'activité contre les protéases. Les protéines WSCP pourraient ne pas être en quantité suffisante dans ce tissu ou tout simplement ne pas avoir d'activité contre les protéases à sérine.

WSCP n'est pas une protéine de stress pendant la photomorphogénèse

Les protéines WSCP sont retrouvées dans les feuilles de nombreuses plantes de la famille des *Brassicaceae*. En conditions normales de culture, comme par exemple chez le radis (*Raphanus sativus*), le chou de bruxelles (*Brassica oleracea var. gemmifera*), le chou-fleur (*Brassica oleracea var. Botrytis*) ou encore *Lepidium virginicum* (Satoh *et al.* 2001 ; Kamimura *et al.* 1997 ; Murata *et al.* 1971 ; Tabata *et al.* 1983). Chez le colza, cette classe de protéines peut être induite en condition de stress salins et déshydratation, et en présence de

l'hormone méthyl-jasmonate (Reviron *et al.* 1992 ; Desclos *et al.* 2008). Nous avons observé une expression atypique de WSCP chez *Arabidopsis*. En effet, elle est exprimée uniquement dans les carpelles des fleurs (Fig. 9, 17, 18, 19 et 23) et contrairement à ce qui était attendu, elle n'est pas induite dans les conditions de stress testées (Fig. 11 et 12). WSCP pourrait être une protéine de stress uniquement dans les plantules étiolées où elle est immunodétectée (Fig. 10)

PARTIE II : WSCP et le développement du pistil

WSCP est une protéine abondante dans le tissu de transmission des fleurs d'*Arabidopsis*

Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années dans l'identification de gènes spécifiquement exprimés dans le stigmate, le style et le tissu de transmission. Notamment avec l'apparition des technologies de criblage à haut débit (*high-throughput fluorescent display screen*) qui ont permis d'identifier de nombreux gènes spécifiques du *gynoecium* en comparant deux mutants d'*Arabidopsis* délétés de gènes homéotiques floraux (Scutt *et al.* 2003). Cette étude a permis de mettre en évidence la présence du transcrit At1g72290 (WSCP) dans les inflorescences. Des hybridations *in situ* ont confirmé l'expression de ce transcrit dans le pistil et plus particulièrement dans le tissu de transmission, chemin emprunté par les tubes polliniques pour atteindre les ovules (Scutt *et al.* 2003). Dans une autre étude, une approche différente a été choisie pour identifier spécifiquement les gènes exprimés dans les tissus du pistil où progressent les tubes polliniques. Sur une puce à ADN contenant 23000 gènes, 149 gènes ont été identifiés dont 115 exprimés spécifiquement dans le style et 34 exprimés spécifiquement dans le tissu de transmission. Ces gènes ont été regroupés en neuf catégories fonctionnelles. Les 2 catégories majoritaires contiennent les gènes codant pour des protéines de fonction inconnue et pour des protéines impliquées dans les différentes voies métaboliques. Une troisième est constituée des gènes dits de défense (Tung *et al.* 2005). Ces derniers sont exprimés de manière constitutive dans le pistil où ils pourraient intervenir dans la résistance des organes floraux aux agents pathogènes (Kononowicz *et al.* 1992 ; de Oliveira *et al.* 1993 ; Lan *et al.* 2004). Comme par exemple, les gènes de défense codant pour les deux β -glucanases qui sont spécifiquement exprimés dans le style et dans le septum des chambres ovariennes (Delp et Palva. 1999). De manière intéressante, les investigations menées par Tung et collaborateurs ont confirmé la présence du transcrit du gène WSCP dans le tissu de transmission. La séquence d'adressage de WSCP est prédite pour être adressée au

réticulum endoplasmique ou sécrétée quelques soient les différents programmes bioinformatiques testés (les différentes données bioinformatiques sont résumées à l'adresse suivante : <http://www.plantenergy.uwua.edu.au/applications/suba>). En plus de *WSCP*, les neuf autres gènes spécifiques du tissu de transmission coderaient pour des protéines sécrétées (Tung *et al.* 2005). Cela mène à la conclusion qu'un nombre important de protéines présente une fonction putative le réticulum endoplasmique ou à la surface des cellules du tissu de transmission où progressent les tubes polliniques. Ces protéines pourraient être impliquées dans la modification des protéines sécrétées ou faire partie de la matrice extracellulaire (Tung *et al.* 2005).

La fusion transcriptionnelle du promoteur *WSCP* au gène rapporteur GUS a montré l'expression de ce gène dans le septum et dans le style des fleurs (Fig. 17), ceci est en accord avec les résultats précédemment publiés (Scutt *et al.* 2003 ; Tung *et al.* 2005). Par ailleurs, nous avons mis au point au sein de notre laboratoire la technique d'immunolocalisation qui nous a permis d'étudier en détail l'expression de *WSCP* dans le stigmate au cours du développement floral. La protéine *WSCP* est exprimée à partir du stade 11 dans les cellules du tissu de transmission de la chambre ovarienne puis également à partir du stade 12 dans les cellules de l'épiderme du septum (Fig. 19). La protéine *WSCP* est également présente dans le tissu de transmission du style à partir du stade 12 mais celle-ci n'est détectée à aucun moment dans les cellules du stigmate (Fig. 18).

WSCP est-elle sécrétée dans le tissu de transmission ?

Les immunolocalisations n'ont pas révélé la présence de protéines *WSCP* dans la matrice extracellulaire constituant le tissu de transmission (Fig. 18-20 et 23). Il est tout à fait possible que les protéines *WSCP* soient localisées dans le réticulum endoplasmique ou à la surface des cellules.

Cependant, des résultats récents nous ont apporté des informations quant à la possibilité d'une sécrétion de *WSCP*. Brian Crawford nous a gracieusement communiqué des résultats d'hybridation *in situ* obtenus avec le transcrit *WSCP* au cours du développement du septum (Fig. 47 A-D). Ces expériences mettent en évidence la présence du transcrit *WSCP* uniquement dans les cellules centrales du tissu de transmission du septum des fleurs aux stades 11 et 12 (Fig. 47 B et D). Or les immunolocalisations montrent très clairement une présence de la protéine *WSCP* au stade 12 dans toutes les cellules du tissu de transmission et les cellules de l'épiderme du septum (Fig. 47 G et H ; flèches noires). La protéine pourrait être

sécrétée des cellules centrales du tissu de transmission vers son environnement le plus proche à savoir, les cellules de l'épiderme du septum et les cellules adjacentes.

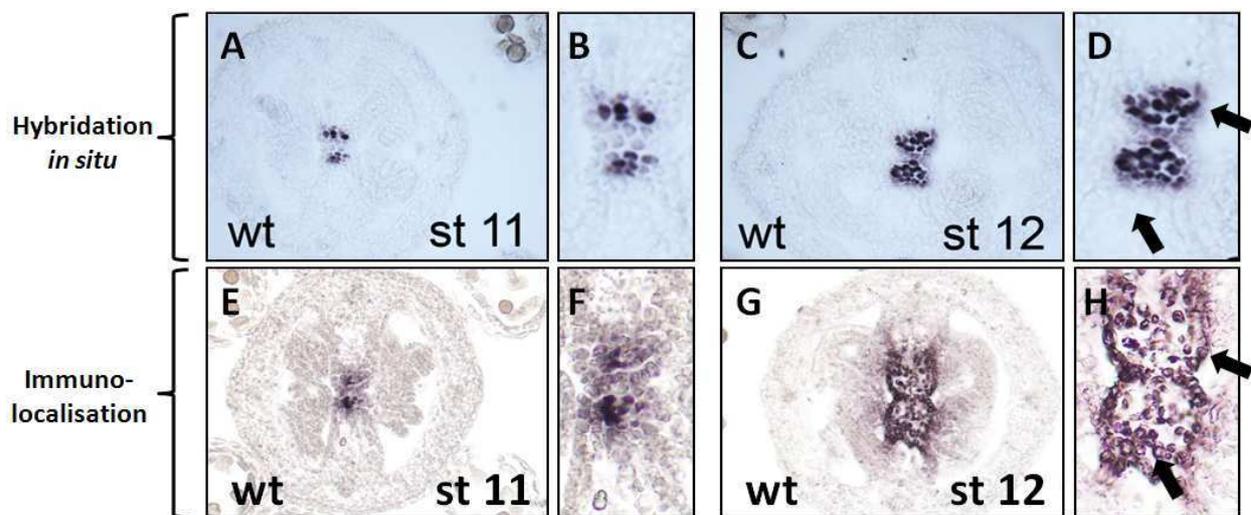


Figure 47: Expression du gène WSCP dans le septum des fleurs WT

Les hybridations *in situ* ont été réalisées et communiquées gracieusement par Brian Crawford (A-D ; résultats non publiés). Les fleurs (stage 11 ou 12) sont fixées, incluses dans la paraffine et des sections de 10 μm sont réalisées. Les coupes sont utilisées pour réaliser des hybridations *in situ* avec une sonde spécifique du transcrite *wscp* (A-D) ou des immunolocalisations avec un anticorps dirigé contre WSCP (E-H). Les figures B, D, F, H sont des agrandissements de la partie centrale du septum des figures A, C, E et G respectivement.

WSCP est impliquée dans la régulation de la mort cellulaire dans le tissu de transmission et dans les cellules épidermique du septum

La mort et la dégénérescence des cellules du tissu de transmission sont essentielles pour faciliter la croissance des tubes polliniques dans le pistil *d'Arabidopsis* ou de *Nicotiana* (Crawford *et al.* 2007 ; Wang *et al.* 1996). La mort cellulaire dans le septum est régulée dans l'espace et dans le temps. Celle-ci est restreinte au tissu de transmission avant l'anthèse et ne se propage pas dans l'épiderme du septum ni dans le style (Crawford *et al.* 2007). Il est tout à fait envisageable d'avoir des gènes impliqués dans les processus de mort cellulaire programmée qui seraient exprimés spécifiquement dans le tissu de transmission au cours du développement. On pourrait également supposer que des protéases seraient spécifiquement activées dans le tissu de transmission pour finalement provoquer la MCP.

Dans le but de comprendre la fonction physiologique de WSCP dans les tissus reproductifs femelles, nous avons étudié la formation et le développement du tissu de transmission et de l'épiderme du septum au cours du développement. Nous avons choisi une plante mutante du *Salk Institute* qui présente une insertion dans l'unique exon du gène WSCP (Salk_009681 ; Fig. 13). *wscp-Salk* est un mutant nul car aucune protéine n'est immunodéetectée dans les inflorescences (Fig. 14). Des complémentations fonctionnelles de ce mutant ont été réalisées afin de s'assurer de la spécificité des phénotypes observés (Fig. 16).

Nous avons étudié la MCP dans le pistil des fleurs émasculées. Dans ces conditions, les fleurs du mutant *wscp-Salk* présentent une mort prématurée des cellules du tissu de transmission par rapport au sauvage (Fig. 24). Par ailleurs, nous avons observé une mort anormale des cellules de l'épiderme du septum lors des stades tardifs du développement floral chez le mutant *wscp-Salk* (Stade 17 ; Fig. 22). La protéine WSCP pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la MCP. Cette idée est appuyée par des observations récentes réalisées au sein de notre laboratoire sur des lignées surexprimant WSCP (sous contrôle d'un promoteur 35S). La MCP semble retardée, ainsi certaines lignées n'ont pas d'espace entre les cellules du tissu de transmission et le replum (résultats non montrés ; apparition de cet espace entre les stades 10 et 11, Fig. B flèches rouges).

Par contre, nous n'avons par contre pas vu de différences entre le mutant et le sauvage concernant la production de matrice extracellulaire (Coloration des polysaccharides acides au bleu d'alcan ; Fig. 21). Ainsi WSCP ne semble pas impliquée dans la régulation de l'activité protéolytique des protéines de la matrice extracellulaire. Toutefois, une analyse détaillée de sa composition doit être entreprise pour confirmer ces résultats préliminaires.

La mort prématurée des cellules du tissu de transmission et anormale des cellules de l'épiderme du septum influencent la croissance des tubes polliniques, la fertilisation et la formation des graines.

Dans le pistil du mutant *wscp-Salk*, les tubes polliniques progressent plus rapidement et une plus grande partie d'entre eux est capable d'atteindre les parties basales du style chez le mutant *wscp-Salk* en comparaison du sauvage (Fig. 25). Par ailleurs, nous avons observé une baisse du nombre des tubes polliniques qui sortent du tissu de transmission vers le septum dans le style du mutant *wscp-Salk* (Fig. 25 et 26). Les expériences de pollinisation minimale ont également révélé un changement dans la morphologie des tubes polliniques. En effet, les tubes polliniques du mutant *wscp-Salk* présentent majoritairement une morphologie fine et une croissance rectiligne qui est typique d'une progression dans le tissu de transmission. En revanche, les tubes polliniques larges et courbés sont faiblement représentés chez ce mutant en comparaison du sauvage (Fig. 26). Cette morphologie est caractéristique des tubes polliniques qui progressent en dehors du septum, c'est-à-dire sur l'épiderme du septum et le funicule (Fig. 26). Finalement, *wscp-Salk* présente une distribution des graines dans la chambre ovarienne différente de celle du sauvage lors des expériences de pollinisation minimale. Les ovules sont préférentiellement fécondés dans la partie la plus basale de la

chambre ovarienne chez *wscp-Salk* alors que chez le sauvage, celles-ci sont plutôt proches de la région centrale (Fig. 27).

Le mutant *wscp-Salk* présente une croissance des tubes polliniques contraire aux observations faites chez les mutants *ntt*, *spt* et *hec1 hec3*. Dans le pistil du mutant *ntt*, la progression des tubes polliniques est affectée du fait d'une absence de dégénérescence du tissu de transmission et de production de matrice extracellulaire caractéristique. Les tubes polliniques ont tous une morphologie courbée et large (Fig. 27 ; Crawford *et al.* 2007). Les gynoecia du mutant *spt* sont caractérisés par un septum sous développé et non fusionné. Ils n'ont pas de tissu de transmission et donc pas de cellules pour sécréter la matrice extracellulaire dans le septum et dans le style. Dans ces conditions, une faible proportion d'ovules se développe en graines à cause d'une difficulté des tubes polliniques à progresser et à les féconder (Alvarez et Smyth. 1999). Chez le double mutant *hec1 hec3*, le mouvement des tubes polliniques est drastiquement réduit car le septum présente un défaut dans sa formation au niveau de l'organisation des cellules épidermiques et une absence de cellules du tissu de transmission. De plus, ce double mutant présente des variations significatives dans la taille des fruits et le nombre de graines (Gremski *et al.* 2007).

Prises ensemble, nos observations vont dans le sens de l'hypothèse émise par Crawford et collaborateur selon laquelle le tissu de transmission fonctionne comme « une voie express » pour la croissance des tubes polliniques. Ainsi, un accroissement de la mort cellulaire dans le tissu de transmission augmente la progression des tubes polliniques qui fécondent préférentiellement les ovules dans la partie basale de la chambre ovarienne (*wscp-Salk*). Inversement, l'absence de mort cellulaire freine la progression des tubes polliniques dans le septum : ils en sortent rapidement pour féconder les ovules situées dans la partie apicale.

Nous avons montré pour la première fois l'implication d'une protéine à domaine Kunitz dans le contrôle de la mort des cellules épidermiques du septum en analysant le développement floral de *wscp-Salk*. L'absence de WSCP cause une mort anormale et une dégradation de l'épiderme du septum (Fig. 22 et 24). Quelle pourrait être la fonction physiologique des cellules épidermiques du septum ? Pourquoi la mort cellulaire est-elle restreinte au tissu de transmission et ne s'étend-elle pas aux cellules de l'épiderme du septum ? Quels sont les facteurs décisifs pour la régulation de la MCP ?

Pour atteindre les ovules, les tubes polliniques doivent traverser l'épiderme du septum. Une des fonctions des cellules de l'épiderme serait de fournir un support physique pour les tubes polliniques jusqu'à ce qu'ils atteignent le funicule. La matrice extracellulaire est sécrétée au travers du point de sortie du tube pollinique. Cela permet aux tubes polliniques d'être entourés de matrice extracellulaire et ainsi d'adhérer au septum (Lennon *et al.* 1998). Au cours du développement du fruit, l'épiderme du septum doit aussi être nécessaire pour le développement des graines. Les changements observés dans l'épiderme du septum n'influencent pas le nombre de graines par silique chez le mutant *wscp-Salk* (Fig. 28 A). Cependant, le développement des graines est quelque peu influencé. Les embryons *wscp-Salk* présentent une activité métabolique réduite d'après les colorations au tetrazolium (Fig. 28 B). Et les graines du mutant montrent un retard de germination de plusieurs heures par rapport au sauvage. Ce délai dans la germination semble être lié à nos observations faites dans le septum car le mutant *wscp-Salk* complétement se comporte comme le sauvage (Fig. 28 D).

WSCP est régulé positivement par les facteurs de transcription NTT et HECATE3

Nous avons montré que WSCP est faiblement immunodétectée chez le mutant nul pour le facteur de transcription NTT par rapport au sauvage (Fig. 20 A). Les immunolocalisations révèlent la présence de WSCP à partir du stade 11 dans seulement quelques cellules du tissu de transmission et dans le style du mutant *ntt* (Fig. 20 B). Par ailleurs, aucune protéine WSCP n'est immunodétectée dans les inflorescences du mutant *hec1 hec3* contrairement au mutant *hec1* qui présente un niveau d'expression et une localisation de la protéine quasiment similaire à celle observée chez le sauvage (Fig. 20 A et B). Les facteurs NTT et HEC3 semblent donc réguler positivement l'expression de WSCP dans les inflorescences. Le rôle de HEC1 n'est pour le moment pas clair, des analyses sur le mutant *hec3* doivent être entreprises afin d'identifier en détail le rôle respectif de HEC1 et HEC3 dans la régulation de WSCP. WSCP pourrait être également régulée par d'autres facteurs de transcription comme SPATULA et ALCATRAZ qui sont décrits comme étant capables d'interagir avec HEC3 dans la levure (Gremski *et al.* 2007 ; données non publiées présentes dans le manuscrit de Gremski). Le facteur de réponse aux auxines ETTIN peut être également un bon candidat car celui-ci régule le niveau d'expression des gènes *HEC* et donc probablement de *WSCP* (Gremski *et al.* 2007).

WSCP interagit avec des protéases à domaine granuline dans la levure et pourrait inhiber leur action au cours du développement du septum

Quelles sont les protéases cibles de WSCP durant le développement du tissu de transmission et de l'épiderme du septum ?

Dans une étude récente, WSCP d'*Arabidopsis* a été décrite comme étant capable d'inhiber l'activité de protéases à cystéine comme la papaïne et la protéase de maturation de la proaleuraine (contenant un domaine granuline ; Halls *et al.* 2007). Les protéases à cystéine de plante sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques allant du développement de la graine à la sénescence (Grudkowska et Zagdanska. 2004). Pendant la formation de la graine, elles sont responsables de la maturation des protéines de stockage (Gruis *et al.* 2004), et plus tard, ces protéases seront impliquées dans la libération d'acides aminés nécessaires à la germination des graines. Par ailleurs, les protéases à cystéine interviennent dans la dégradation des protéines intracellulaires notamment pendant la sénescence (Chen *et al.* 2002) et dans la résistance des plantes contre les pathogènes (D'Silva *et al.* 1998). Elles sont induites pendant la MCP par exemple lors de la formation des tissus conducteurs lignifiés (Fukada. 2000). Malheureusement, peu d'informations sont disponibles sur les protéases à cystéines pendant le développement du gynoeccium et plus spécialement pendant la croissance des tubes polliniques.

Des expériences de double hybride ont été réalisées entre WSCP et les quatre protéases à cystéine contenant un domaine granuline que nous avons identifié dans le génome d'*Arabidopsis*. Nous avons montré l'interaction entre WSCP et trois de ces quatre protéases dans la levure (Fig. 29). WSCP interagit ainsi avec la protéine codée par le gène At3g19390, ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, WSCP est capable d'inhiber l'activité de cette enzyme *in vitro* laissant présager une interaction (Halls *et al.* 2007). Par contre, WSCP n'interagit pas dans la levure avec la protéine XBCP3 (Xylem Bark Cysteine Protease 3) exprimée *in planta* dans les tissus conducteurs des feuilles de rosette (Fig. 29 ; Funk *et al.* 2002). Seule RD21 interagit avec WSCP dans les deux combinaisons proie/cible testées par double hybride (Fig. 29). Elle fait partie des protéases à cystéine de la famille des papaïnes dont l'expression augmente en conditions de déshydratation (Koizumi *et al.* 1993 ; Fig. 11), pendant les stress salins et lors de la sénescence (Yamaguchi-Shinozaki *et al.* 1992 ; Gepstein *et al.* 2003 ; Fig. 12). RD21 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 57 kDa avec un propeptide en N-terminal et une région riche en prolines suivie d'un domaine granuline en C-

terminal. Le domaine N-terminal est ôté en premier donnant ainsi la forme intermédiaire (iRD21) de 38 kDa puis la protéine est progressivement clivée pour donner la forme mature de 33kDa (mRD21). Les deux isoformes sont immunodétectées dans les vacuoles. La forme intermédiaire contient le domaine granuline et forme aisément des agrégats en conditions acides. iRD21 et mRD21 semblent s'accumuler différemment selon les conditions (germination et sénescence respectivement ; Yamada *et al.* 2001). Nous avons montré que les deux isoformes de RD21 sont présentes dans les fleurs au cours du développement. Dans les inflorescences, le niveau de la forme intermédiaire est nettement majoritaire par rapport à la forme mature (résultat non montré). Le clivage séquentiel du précurseur RD21 doit être un mécanisme de régulation de son activité protéolytique. En effet, le propeptide N-terminal, présent chez RD21, est connu pour recouvrir et ainsi inhiber le site actif des cathepsines B et S humaine (Turk *et al.* 1996 ; Maubach *et al.* 1997). L'activation de la protéase nécessite donc le clivage de ce propeptide. Par ailleurs, la forme intermédiaire est capable de former des agrégats dans la vacuole qui pourrait être un autre mécanisme d'inhibition de l'activité protéolytique de RD21 (Yamada *et al.* 2001). Une voie complètement différente de régulation de l'activité de RD21 a été décrite dans les cellules de l'endothélium des graines en développement. Dans le cas présent, PDI5 (*protein disulfide isomerase-5*) progresse avec RD21 du réticulum endoplasmique vers les protéines de stockage ou les vacuoles lytiques. PDI5 est capable d'inhiber l'activité des protéases à cystéine recombinantes *in vitro* et est majoritairement présente dans les tissus floraux et les graines en développement. Dans ces deux tissus, son expression dans les cellules endothéliales précède la MCP. Le mutant nul *pdi5* présente une initiation précoce de la MCP dans les cellules endothéliales de l'embryon. L'un des phénotypes observés chez ce mutant est une baisse de la viabilité des graines (Ondzighi *et al.* 2008).

L'interaction de RD21 avec des inhibiteurs de protéase pourrait être une autre voie de régulation de son activité. Les plantes ont la capacité de contrôler la MCP par l'activation de protéases à cystéine comme chez le soja (*Glycine max*) par exemple. L'expression ectopique d'un inhibiteur endogène de ces protéases à cystéine, la cystatine, provoque l'inhibition de ces protéases et bloque la MCP (Salomon *et al.* 1999). Nos observations nous ont amené à proposer un rôle de WSCP dans le contrôle dans l'inhibition de l'activité de RD21 dans le septum. Le contrôle précis de RD21 semble important durant le développement du tissu de transmission, de l'épiderme du septum et, plus tard, de la graine. Nous avons vu une accumulation de RD21 dans toutes les parties du pistil à différents niveaux par

immunolocalisation (Fig. 30). WSCP pourrait interagir avec RD21 dans les tissus reproducteurs femelles afin d'inhiber son activité protéolytique jusqu'aux stades tardifs du développement floral. Par la suite, le niveau de WSCP diminue dans le tissu de transmission induisant l'activation de RD21 et indirectement de la MCP. WSCP et RD21 doivent interagir dans les mêmes compartiments cellulaires selon les prédictions bioinformatiques (Tung *et al.* 2005 ; Yamada *et al.* 2001). Bien que nous n'ayons pas pu montrer une inhibition de RD21 par WSCP lors des essais *in vitro*, nous avons cependant montré le rôle de WSCP dans la régulation de la MCP dans le septum. Le mutant *wscp-Salk* présente une mort prématurée des cellules du tissu de transmission au cours d'expériences d'émasculations et une mort anormale des cellules du septum au cours des stades tardifs du développement floral (Fig. 22, 24, 48). Le phénotype sauvage est retrouvé en réalisant des complémentations fonctionnelles avec le gène WSCP (Fig. 24).

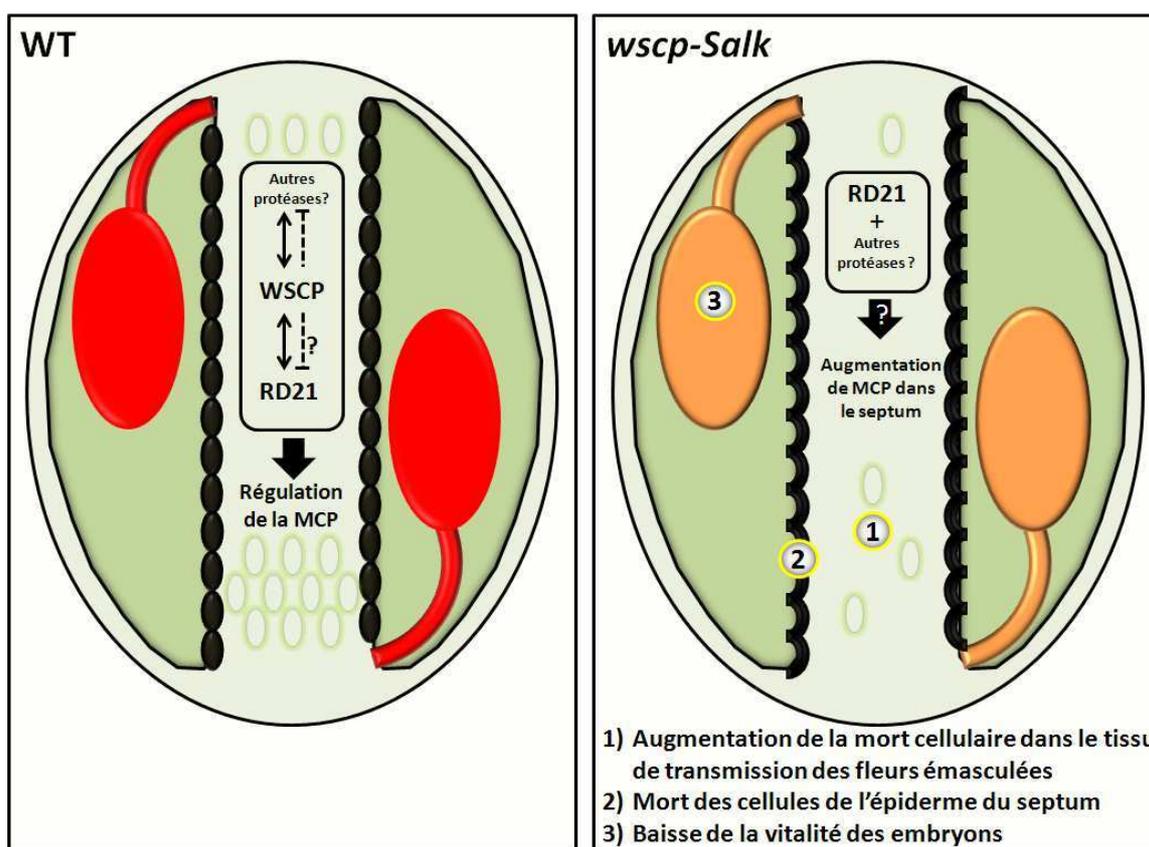


Figure 48: Schéma récapitulatif des différences observées entre le pistil du sauvage et du mutant *wscp-Salk* au cours du développement floral.

Le processus de MCP des cellules du tissu de transmission est accéléré et s'étend aux cellules de l'épiderme du septum chez *wscp-Salk* (Ovales verts et noirs ; 1 et 2). Une des conséquences pourrait être une diminution de la vitalité des embryons (Colorations au tétrazolium ; 3) et un retard de germination de quelques heures.

Partie III : Expression de WSCP dans les plantules étiolées

WSCP est exprimée dans la crosse apicale des plantules étiolées d'*Arabidopsis thaliana*

Le promoteur du gène *WSCP* est actif dans la crosse apicale et l'hypocotyle des plantules étiolées (Fig. 31 C-E). Cependant, la protéine WSCP est faiblement immunodétectée dans ces tissus par rapport aux inflorescences (Fig. 31 B). A notre connaissance, c'est la première fois qu'une protéine à domaine Kunitz est caractérisée dans ces tissus chez *Arabidopsis thaliana*.

Une équipe espagnole a mis en évidence par immunolocalisation la présence de deux protéines à domaine Kunitz dans la crosse apicale et la partie supérieure de l'hypocotyle des plantules étiolées de pois-chiche (CaTPI-1 et CaTPI-2 ; Jiménez *et al.* 2007 ; Jiménez *et al.* 2008). Cette même équipe a émis l'hypothèse d'un rôle de ces protéines dans les processus d'élongation cellulaire et de formation des tissus conducteurs. De notre côté, nous n'avons remarqué aucune différence significative dans la croissance de l'hypocotyle et dans la formation de la crosse apicale chez le mutant *wscp-Salk* ou le surexprimeur *35S::WSCP* (Fig. 32). Par ailleurs, la formation des tissus conducteurs ne présente aucune altération en coloration au *Fast Green FCF* (Résultat non montré). Il est tout à fait possible que d'autres protéines à domaine Kunitz puissent être impliquées dans les processus énoncés précédemment. En effet, des études bioinformatiques nous ont révélé la présence de deux autres transcrits appartenant à cette famille dans l'hypocotyle et les racines des plantules étiolées : *AtDr4* (Gosti *et al.* 1995) et *At1g17860* (Alonso *et al.* 2003 ; <http://www.bar.utoronto.ca>). Les protéines codées par *AtDr4* et *At1g17860* présentent respectivement 45 % et 47 % d'homologies de séquences avec CaTPI-1 et CaTPI-2 (numéros d'accèsion : CAB76906 et CAB76907 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Nous avons observé une régulation négative de *WSCP* à la lumière (Fig. 43 A) comme cela a été observé pour le transcrit du gène *CaTPI-1* chez les plantules étiolées de pois-chiche (Jiménez *et al.* 2007). Ceci nous amène à penser que WSCP pourrait jouer un rôle pendant la skotomorphogénèse et/ou le dé-étiolement. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré l'implication d'un homologue des protéines WSCP chez l'orge au cours du dé-étiolement. Cette protéine serait impliquée dans le stockage transitoire de pigments chlorophylliens avant la mise en place des membranes thylacoïdiennes et des photosystèmes

(Reinbothe *et al.* 2004). Nous avons testé cette hypothèse en réalisant des tests de photoblanchiment. Les plantules étiolées d'*Arabidopsis* sont exposées à une lumière de forte intensité : durant cette période, une grande quantité de chlorophylle est synthétisée. Ces pigments peuvent avoir des effets délétères si ils n'interagissent pas avec des partenaires protéiques (Pollmann *et al.* 2007 ; Buhr *et al.* 2008). Nous n'avons remarqué aucun photoblanchiment du mutant *wscp-Salk* par rapport au sauvage (Partie 4.B). Par ailleurs, ce même mutant ne présente aucun défaut dans l'ouverture de cotylédons et dans le verdissement (Fig. 44). Des tests de dosage de la chlorophylle devront être toutefois entrepris pour confirmer les premières observations phénotypiques.

Les facteurs de transcription NTT et HEC ne régulent pas l'expression de WSCP de la même façon que ce soit dans les plantules étiolées ou dans les inflorescences

Nous avons vu précédemment l'implication de deux facteurs de transcription dans la régulation de WSCP dans le pistil des fleurs d'*Arabidopsis*. Nous nous sommes demandé si ces mêmes facteurs pouvaient jouer un rôle dans la régulation du gène WSCP dans les plantules étiolées. Les transcrits *NTT* et *HEC* sont présents à l'obscurité (Fig. 33 ; *HEC2* est également présent, résultat non-montré). Grâce à l'étude de plantes mutantes pour ces facteurs de transcription, nous avons conclu à une régulation négative par *NTT* et positive par *HEC1* des transcrits WSCP dans les plantules étiolées (Fig. 34, 40). La protéine *HEC3*, contrairement à nos observations faites dans le pistil, ne semble pas jouer un rôle dans cette régulation ou *via* une éventuelle répression du transcrit *NTT* qui reste à confirmer (Fig. 20, 34).

Les promoteurs des gènes *HEC1* et *WSCP* sont actifs dans la crosse apicale des plantules étiolées (Fig. 31 C-E et 35). *HEC1* pourrait réguler positivement la transcription de *WSCP* dans la crosse apicale. Cependant, le promoteur *HEC1* est actif également dans les cotylédons. Or, nous n'avons observé à aucun moment de notre étude une présence de la protéine WSCP par immunolocalisation ou une activité du promoteur de ce même gène dans ce tissu (Fig. 31, 36 et 39). Des facteurs comme *NTT* pourraient réprimer le transcrit *WSCP* dans les cotylédons. Des lignées *pNTT::GUS* ou des expériences d'hybridation *in situ* auraient été intéressantes pour éclaircir le rôle de ce facteur de transcription dans la régulation du gène *WSCP* dans les différents tissus au cours de la skotomorphogénèse.

La Protéine WSCP est surexprimée en présence d'éthylène sous le contrôle de NTT et HEC1

Plusieurs hormones ont été décrites ces dernières années pour leur implication dans la formation de la crosse apicale à l'obscurité (Dugardeyn *et al.* 2008 ; Li *et al.* 2004). L'une d'entre elle, l'éthylène, est connue pour induire « la triple réponse » chez les plantules étiolée se traduisant par : (i) inhibition de l'élongation de l'hypocotyle ; (ii) exagération du développement de la crosse apicale ; (iii) arrêt du développement des racines (Guzman et Ecker. 1990).

Nous avons remarqué une augmentation importante du transcrit et de la protéine WSCP en présence du précurseur directe de l'éthylène (Fig. 37 et 38). Ce résultat est en accord avec les analyses par *microarray* des transcrits qui montrent une augmentation d'un facteur 8 du transcrit WSCP dans les plantules étiolees en présence d'éthylène (Alonso *et al.* 2003 ; données complémentaires). L'augmentation du niveau de transcrit WSCP ne dépend pas du facteur de transcription HEC1 en présence d'éthylène. En effet, le niveau de WSCP est proche entre le mutant *hec1* et le sauvage (Fig. 40). Par ailleurs, le facteur de transcription NTT réprime également le transcrit WSCP en présence de cette même hormone (Fig. 40).

HEC3 pourrait être impliquée dans l'augmentation du transcrit WSCP mais des RT-PCR semi-quantitatives restent à faire chez le double mutant *hec1 hec3* pour tenter de répondre à cette question. L'autre facteur de transcription HEC2 pourrait être impliqué au même titre que HEC3 dans la régulation de ce transcrit en présence de l'hormone éthylène.

D'autres facteurs de transcription sont de bons candidats pour entrer dans la voie de régulation du gène WSCP en présence d'éthylène. En effet, les trois protéines HEC sont capables d'interagir dans la levure avec les protéines SPATULA et ALCATRAZ (Gremski *et al.* 2007 ; et données non publiées). Le facteur de transcription SPATULA est impliqué dans le processus de germination et dans le développement floral (Penfield *et al.* 2005). De plus, les transcrits SPATULA et ALCATRAZ persistent après la germination dans les plantules étiolees (Alonso *et al.* 2003 ; données complémentaires).

L'hormone auxine régule négativement le gène WSCP

L'activité du promoteur WSCP et la présence du transcrit correspondant sont très fortement réprimés en présence de l'hormone auxine (Fig. 36 et 37).

Les promoteurs des gènes impliqués dans la voie de transduction de l'hormone auxine sont exprimés dans la partie concave de la crosse apicale des plantules étiolées (Fig. 49 A, D et F; Žadníková *et al.* 2010 ; De Grauwe *et al.* 2005). Leur activité augmente dans ce même tissu en présence d'éthylène (Fig. 49 B, E et G). Nous avons observé une coloration GUS uniforme dans la crosse apicale des lignées *pWSCP::GUS* mais la protéine WSCP n'est présente que dans la partie convexe lors de l'ajout d'éthylène (Fig. 36, 39, 50). L'auxine pourrait être impliquée dans la régulation de la stabilité du transcrit, de sa traduction et/ou dans le *turnover* de la protéine WSCP dans la partie concave de la crosse apicale des plantules étiolées en présence d'éthylène.

En présence de brassinostéroïdes, nous avons observé une augmentation de l'activité du promoteur *WSCP* grâce au gène rapporteur GUS et également un net accroissement du niveau de transcrits *WSCP* par rapport au contrôle (Fig. 36 et 37). Cependant, l'augmentation des transcrits *WSCP* ne s'accompagne pas d'une accumulation de la protéine comme nous l'avons vu précédemment avec l'éthylène (Fig. 38 et immunolocalisations non montrées). De Grauwe et collaborateurs ont montré une activité uniforme d'un promoteur impliqué dans la voie de transduction de l'auxine dans la crosse apicale en présence de brassinostéroïdes (Fig. 49 C; De Grauwe *et al.* 2005). L'auxine agit probablement comme un régulateur négatif du transcrit *WSCP* dans la partie concave de la crosse apicale en présence d'éthylène et dans la totalité de ce tissu en présence de brassinostéroïdes.

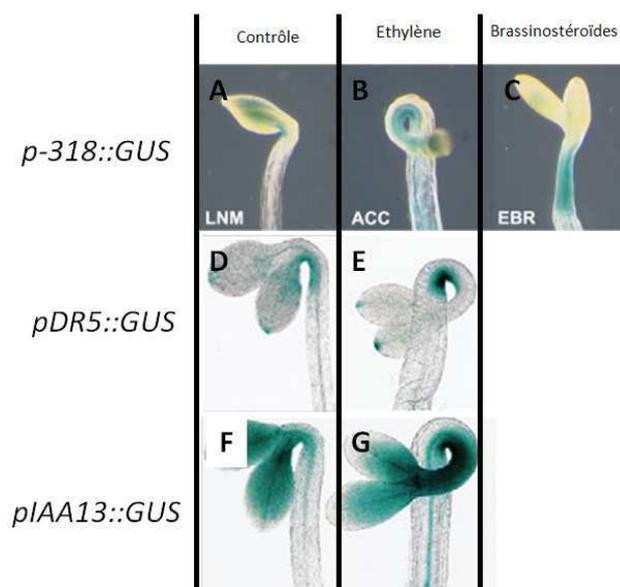


Figure 49 : Analyse de l'expression de promoteurs de gènes impliqués dans la voie de transduction de l'auxine dans les plantules étiolées en présence d'éthylène et de brassinostéroïdes.

Des fusions transcriptionnelles sont réalisées entre le promoteur de gènes impliqués dans la voie de transduction de l'auxine et le gène rapporteur *GUS*. Les photos sont issues des articles de De Grauwe *et al.* 2005 (*p-318::GUS*) et de Žadníková *et al.* 2010 (*pDR5::GUS* et *pIAA13::GUS*). Les graines sont semées sur milieu nutritif supplémenté ou non en hormones (A, D, F). Les plantules ont été colorées et photographiées. Les concentrations en hormones sont de 10 μ M ACC (Précurseur de l'éthylène; B, E et G) et 100 nM EBR (Brassinostéroïdes; C).

Le transcrit *WSCP* est-il régulé négativement en présence d'auxine via les gènes *HEC*?

Nous avons vu une baisse du transcrit *HEC1* en présence d'auxine par rapport au contrôle dans les plantules étiolées par RT-PCR semi-quantitative (Fig. 37). Ce même type d'étude a été réalisée sur le transcrit *HEC3* qui présente comme *HEC1* une baisse de son expression en présence de cette hormone (résultat non montré). La répression de ces facteurs de transcription doit avoir un effet direct sur les transcrits *WSCP* en présence d'auxine. Pour tester cette hypothèse, le mutant surexprimeur *35S::HEC1* doit être semé sur un milieu supplémenté en auxines et le niveau de transcrit *WSCP* analysé dans les plantules étiolées.

WSCP est-elle une protéine induite en conditions de stress au cours de l'étiolation ?

Le promoteur *WSCP* est induit lors de blessures par coupure des plantules étiolées (Fig. 45). La protéine *WSCP* pourrait être impliquée dans la protection en conditions de stress comme cela a été montré pour la protéine *AtKTI1* appartenant à la même famille chez *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.* 2008). En effet, de nombreuses protéines à domaine Kunitz ont été décrites dans la littérature pour leur capacité à être induites en conditions de stress mécaniques ou pour jouer un rôle défensif contre les prédateurs et les pathogènes (Ryan, 1990). Ces protéines ont la capacité d'inhiber certaines enzymes digestives d'insecte limitant ainsi par cet effet leur prolifération (Laskowski et Kato, 1980). Nous n'avons réalisé pour l'instant que des expériences préliminaires d'études d'activité de promoteur *WSCP* grâce au gène rapporteur *GUS* en conditions de stress mécaniques. Ces résultats doivent être bien évidemment confirmés au niveau transcriptionnel et protéique.

Nous avons aussi l'intention de tester les stress salins et hydriques sur les plantules étiolées. Ceux-ci sont décrits dans la littérature pour induire l'expression des protéines de la famille des *WSCP* chez d'autres *Brassicaceae* (Sato *et al.* 2001). Alice Vayssière, stagiaire en Licence 3 dans notre laboratoire, a observé une très nette amélioration de la croissance des jeunes plantules surexprimant *WSCP* sur des milieux riches en sels ou mimant un stress hydrique, à la lumière. *WSCP* n'est pas induite dans les tissus photosynthétiques suite à ce type de stress (Fig. 11 et 12) mais il est tout à fait envisageable d'avoir une expression de cette protéine avec ces mêmes conditions uniquement pendant la skotomorphogénèse.

WSCP est-elle présente dans la paroi cellulaire des plantules étiolées ?

Jiménez et collaborateurs ont montré par immunolocalisation la présence des protéines à domaine Kunitz CaTPI-1 et 2 dans la paroi des plantules de pois-chiche étiolées (Jiménez *et al.* 2007 ; Jiménez *et al.* 2008 ; Hernández-Nistal *et al.* 2009). Nous observons également une immunodétection de WSCP au niveau de ce qui semble être la paroi cellulaire (Fig. 39). Mais la méthode utilisée donne des colorations qui diffusent lors de la révélation des immunolocalisations (celle-ci s'accroît avec le temps d'incubation). Il nous semble difficile dans ces conditions d'affirmer une présence de notre protéine d'intérêt dans la paroi et non dans le cytoplasme par exemple. D'autant plus que dans les cellules végétales, le cytoplasme, la membrane et la paroi sont très proche du fait de l'espace occupé par la vacuole.

Nous pourrions améliorer le protocole de préparation des échantillons de plantules étiolées en jouant notamment sur les méthodes d'inclusion des tissus. Les coupes réalisées dans la figure 39 sont d'une qualité bien inférieure à celle obtenues avec les inflorescences (Partie II). Une autre possibilité serait de purifier les parois des cellules de la crosse apicale de plantules étiolées en présence d'éthylène puis, de réaliser des immunodétections sur ces extraits protéiques dans le but de savoir si un enrichissement de la protéine WSCP est observé dans cette fraction cellulaire.

WSCP est-elle une protéine impliquée dans l'émergence ?

L'éthylène est une hormone impliquée dans de nombreux processus physiologiques au cours du développement (Kieber. 1997 ; Bleecker. 2000). Cette hormone comme le jasmonate et l'acide salicylique est également caractérisée pour son implication dans les processus de réponse aux stress (Glazebrook. 2001 ; Cheong *et al.* 2002).

La majorité des contraintes mécaniques se produisent dans la crosse apicale au cours de l'émergence du substrat des plantules étiolées. Or, nous avons observé une induction de l'activité du promoteur *WSCP* lors de ces mêmes contraintes (Fig. 45). Il est tout à fait plausible que ce stress fasse intervenir l'hormone éthylène impliquée dans l'induction de la protéine WSCP dans la crosse apicale (Fig. 39) afin de préserver l'intégrité des tissus de la crosse apicale au cours de l'émergence.

Les protéases à cystéine codée par le gène At5g43060 et RD21 ont été isolées dans la paroi des plantules étiolées. Leur rôle n'est pas connu en détail mais celles-ci pourraient être impliquées dans la dégradation des composants protéiques de la paroi (Irshad *et al.* 2008). Or, nous avons caractérisé une interaction de WSCP avec ces protéases dans la levure (Fig. 29) et

une probable localisation de notre protéine d'intérêt dans la paroi en présence d'éthylène (Fig. 39). WSCP pourrait alors jouer un rôle en inhibant ces protéases dans la partie convexe de la crosse apicale et ainsi rigidifier la paroi afin de permettre aux plantules étiolées de progresser dans un substrat source de stress mécaniques.

Nous avons expérimenté nos hypothèses en réalisant des tests d'émergence de plantules sauvages et *wscp-Salk* (cf. matériels et méthodes). La proportion des plantules émergées des deux lignées est la même pour un substrat avec une faible proportion en agent solidifiant (Fig. 46). Une nette différence est visible entre le pourcentage de plantules émergées sauvage et mutante pour des concentrations plus importantes en agent solidifiant (Fig. 46). Les plantules étiolées *wscp-Salk* présentent un défaut dans l'émergence. Ces résultats sont récents et ils n'ont pas été réalisés avec les complémentations fonctionnelles du mutant *wscp-Salk*, les surexprimeurs *35S::WSCP* ou encore le mutant *hec1*.

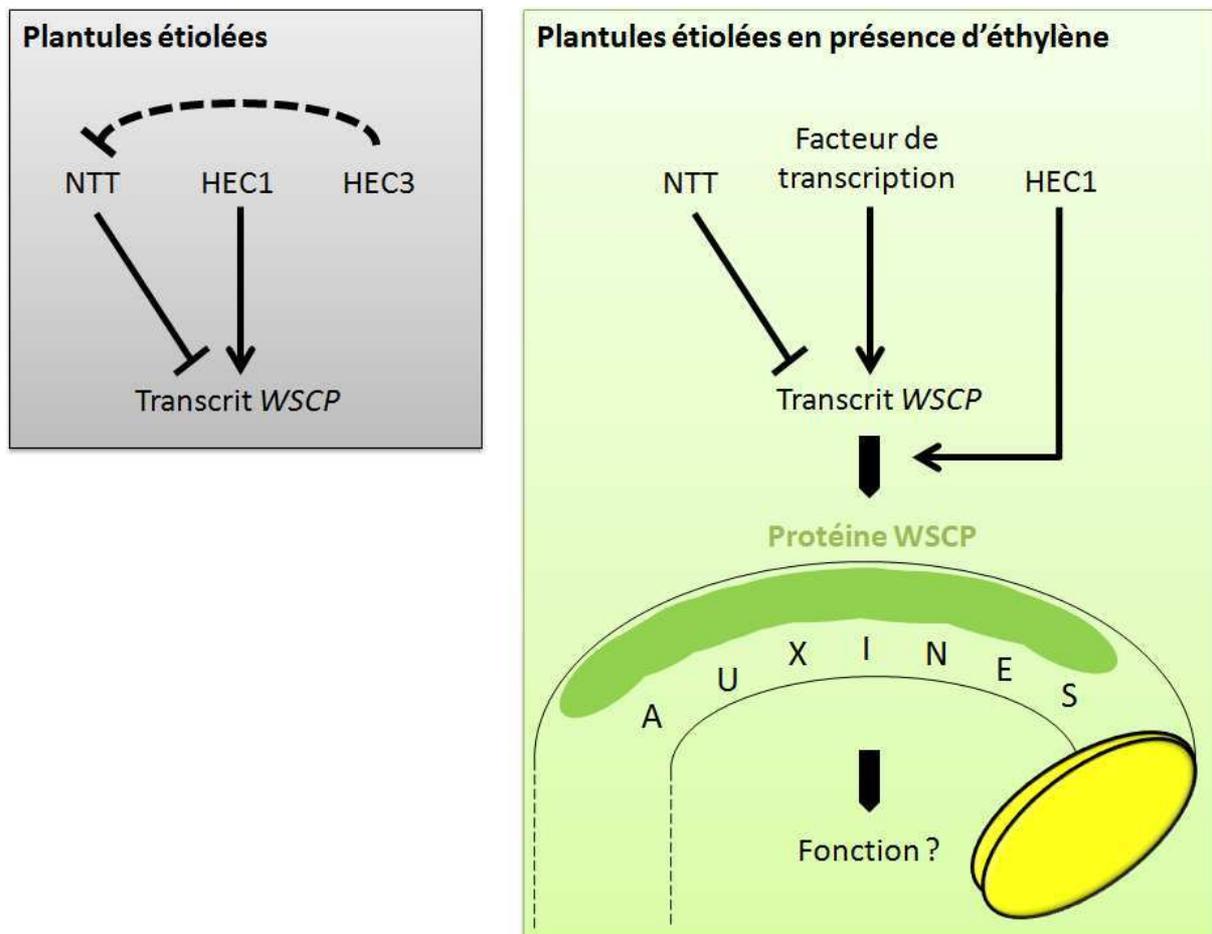


Figure 50 : Schéma récapitulatif de la régulation du gène WSCP dans les plantules étiolées en présence ou non d'éthylène.

Partie gauche) Les transcrits *WSCP* sont régulés positivement par HEC1 et négativement par NTT. HEC3 semble être impliquée dans une régulation du transcript *NTT*.

Partie droite) Les transcrits *WSCP* sont également régulés négativement par NTT en présence d'éthylène. HEC1 ne semble pas impliquée dans l'accumulation observée des transcrits *WSCP* en présence de cette hormone mais dans sa régulation post-transcriptionnelle. La protéine WSCP s'accumule dans la partie convexe de la crosse apicale probablement au niveau de la paroi. Les gènes de biosynthèse de l'auxine sont exprimés dans la partie concave en présence d'éthylène. L'auxine pourrait réprimer le transcript et la protéine WSCP dans cette partie de la crosse apicale.

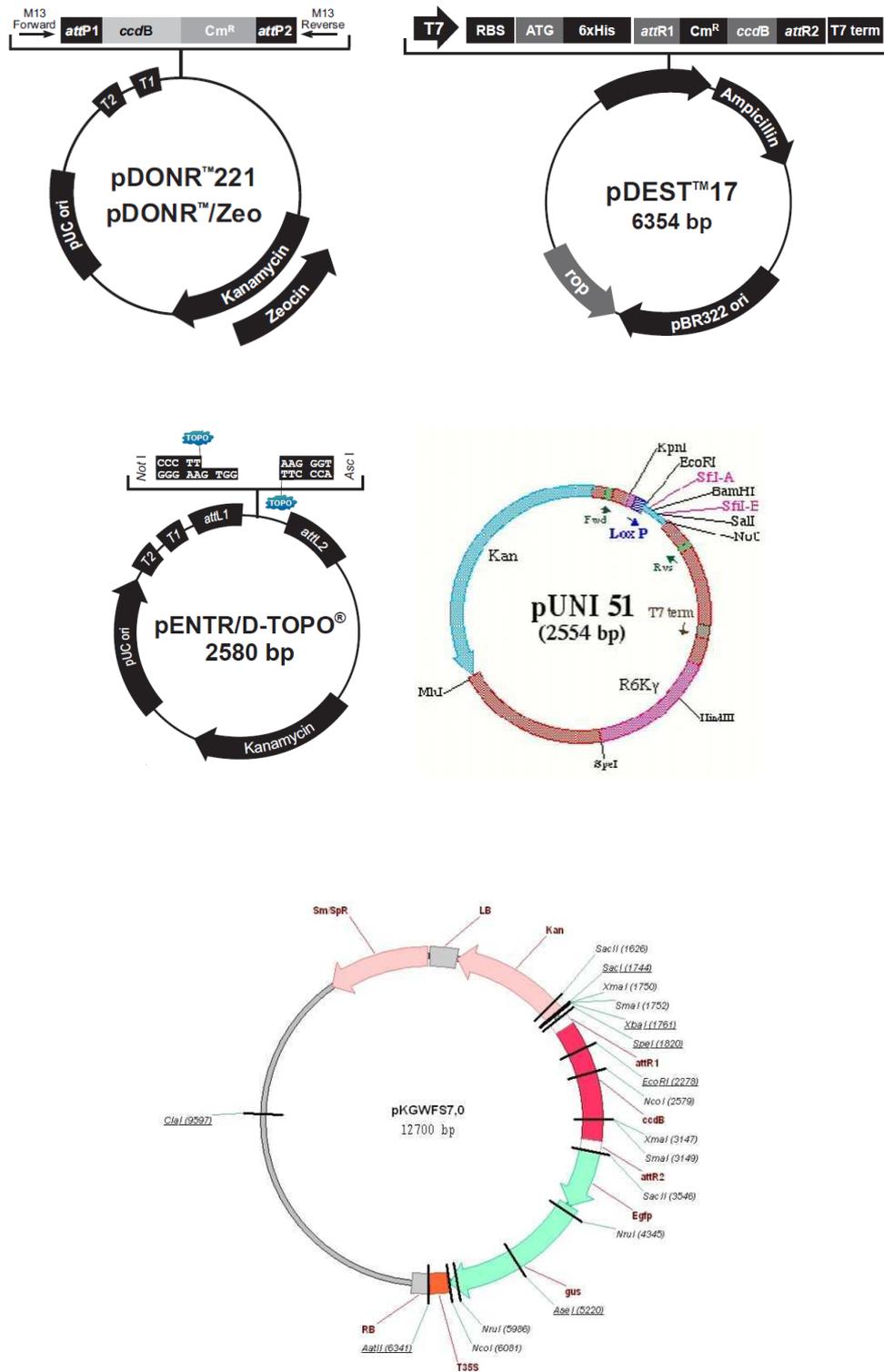
En conclusion à l'issue de ce travail, nous avons montré dans un premier temps que la protéine *WSCP* n'est pas induite en conditions de stress pendant la photomorphogénèse. En revanche, elle est exprimée dans les plantules à l'obscurité (étiolées) et dans le tissu de transmission des fleurs, lieu de passage des tubes polliniques.

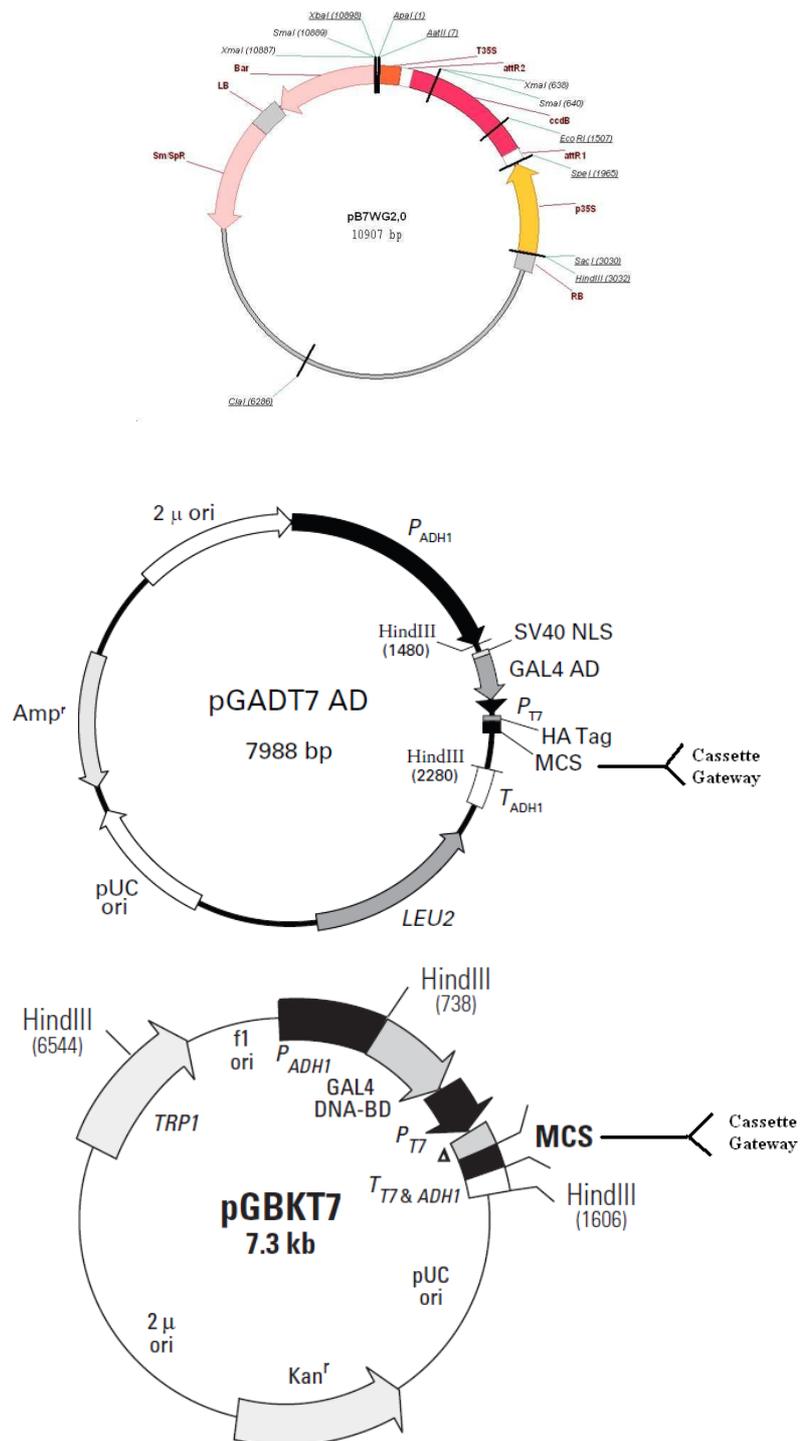
Dans la fleur, nous avons mis en évidence la régulation de *WSCP* par les facteurs de transcriptions *HEC* et *NTT* impliqués dans le développement floral. Par une approche de génique inverse, nous avons montré un rôle de *WSCP* dans le contrôle de la mort cellulaire du tissu de transmission. En conséquence, la progression des tubes polliniques est altérée et la mort cellulaire non spécifique influence le développement des graines.

Chez les plantules étiolées, le transcrit *WSCP* est exprimé au niveau de la crosse apicale, structure dont la fonction est de protéger les plantules au cours de l'émergence hors du sol. De manière intéressante, les facteurs *NTT* et *HEC* sont également exprimés dans les plantules étiolées mais régulent l'expression du gène *WSCP* de façon différente. De plus, la protéine *WSCP* s'accumule en présence de l'hormone de stress éthylène dans la crosse apicale et l'activité du promoteur du gène *WSCP* augmente en conditions de stress mécaniques. Prises ensemble, ces expériences laissent présager d'un rôle protecteur de la protéine *WSCP* au cours de la skotomorphogénèse.

ANNEXES

Annexe 1 : Carte des vecteurs utilisés



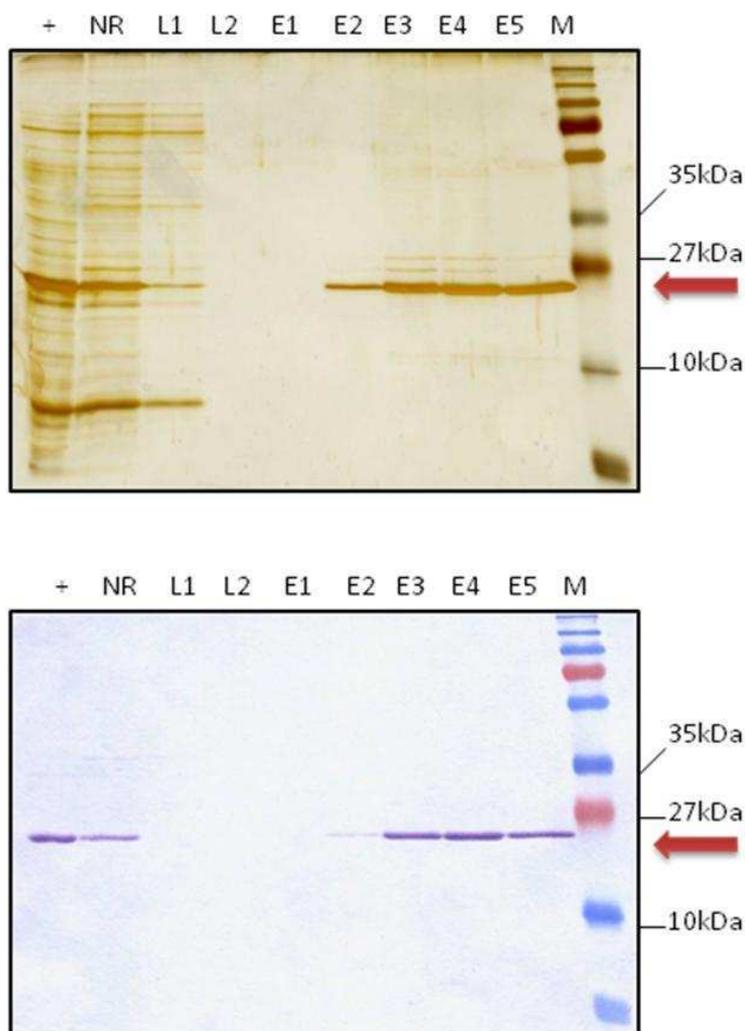


Les vecteurs pDONR221, pDEST17 et pENTR/D-TOPO proviennent du fournisseur Invitrogen. Les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 ont été achetés chez la société Clontech. Une cassette Gateway a été ajoutée à ces vecteurs au niveau du site multiple de clonage par Gilles Vachon (CEA) à l'aide du kit *Gateway Vector Conversion System*. Les vecteurs pB7WG2 et pKGWFS7 proviennent du *Plant system Biology VIB-Ghent University* (Karimi *et al.* 2002).

Annexe 2 : Listes des amorces utilisées pour la PCR

Nom	Séquence 5'-3'	Utilisation
pWSCP-D	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGACAAATTACAAAAATGG	clonage promoteur
pWSCP-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGATTGTTATGTGTGTTTATAGGG	clonage promoteur
At3g19390-GTW-D	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGTACAGCGACGGAGACTAC	clonage dans pDONR221
At3g19390-GTW-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAGCGCTGCCCACTAGC	clonage dans pDONR221
At5g43060-GTW-D	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACATGTC AATCATCTCC	clonage dans pDONR221
At5g43060-GTW-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACGCAATGTGCTTTCTG	clonage dans pDONR221
RD21-GTW-D	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGTGGACATGTCAATCATC	clonage dans pDONR221
RD21-GTW-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGCAATGTCTTTCTG	clonage dans pDONR221
XBCP3-GTW-D	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGACATCTCTGAGCTATTC	clonage dans pDONR221
XBCP3-GTW-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACATAACCCATTCCTCAAATC	clonage dans pDONR221
ntt-F	TTCTCATTTGGCCCTACTCAG	RT-PCR
ntt-R	TTGTTCTACCTCAGAGGCAGG	RT-PCR
hecate1-F	TAATGTGTTTGAAGGGTCTG	RT-PCR
hecate1-R	CCATATCGATCCCGAGGC	RT-PCR
hecate2-F	CGATCAAAACCCCTCCTCC	RT-PCR
hecate2-R	CTAATGAACATGATGATGCAGC	RT-PCR
hecate3-F	CCGCATAATGCCACACCC	RT-PCR
hecate3-R	CTCCTCTCTTCTTCCCTC	RT-PCR
actin-F	CAGAATCAGATATCTAAAAATCCCGGAAA	RT-PCR
actin-R	TGGGATGACATGGAGAAGAT	RT-PCR
WSCP1-D	TGGCATGAGGAAAAAGCCAAG	Génotypage
WSCP1-R	TCAATGTTTTCTCAAGCTCAA	Génotypage
GT2-left-border-D	CTTAATCGCCTTGCAAGCAATC	Génotypage
NPT2	CAATATCACGGGTAGCCAAC	Sonde ADN-T Southern blot

Annexe 3 : Expression et purification sur colonne d'affinité en condition dénaturante de la protéine recombinante WSCP comprenant sa séquence d'adressage



Production et purification de la protéine recombinante WSCP comprenant sa séquence d'adressage.

La production de la protéine WSCP étiquetées histidine est induite en présence d'arabinose chez *E. coli* (puits 1). Après lyse des cellules, les protéines recombinantes sont purifiées sur colonne de nickel (puits 2 à 9). M : marqueur de poids moléculaire ; I : induction de l'expression de WSCP ; NR : protéines non retenues ; L : lavages ; E : élution. Les protéines sont révélées par coloration du gel au nitrate d'argent après séparation sur gel SDS-PAGE (A). Les protéines recombinantes sont immunodétectées par western blot avec l'anticorps anti-histidine (B). Une protéine est élue à la taille attendue en présence d'imidazole (E2 à E5) avec une faible quantité de contaminations. Ces bandes sont immunodétectées par l'anticorps anti-Histidine prouvant la spécificité la protéine purifiée. Les fractions éluées sont rassemblées, dosées et utilisées pour l'immunisation deux lapins (2mg)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Alvarez, J. and Smyth, D.R. (1999) CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development*, **126**, 2377-2386.
- Alvarez, J. and Smyth, D.R. (2002) CRABS CLAW and SPATULA Genes Regulate Growth and Pattern Formation during Gynoecium Development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences*, **163**, 17-41.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 373-399.
- Arai, S., Matsumoto, I., Emori, Y. and Abe, K. (2002) Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. *J Agric Food Chem*, **50**, 6612-6617.
- Atkinson, A.H., Heath, R.L., Simpson, R.J., Clarke, A.E. and Anderson, M.A. (1993) Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell*, **5**, 203-213.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and O'Brien, E.A. (2001) The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol*, **134**, 95-102.
- Bateman, A. and Bennett, H. (1998) Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol*, **158**, 145-151.
- Beale, S.I. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, **60**, 43-73.
- Bethke, P.C. and Jones, R.L. (2000) Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 469-475.
- Beyer, E.M. (1976) A Potent Inhibitor of Ethylene Action in Plants. *Plant Physiol*, **58**, 268-271.
- Birk, Y. (2003) Plant protease inhibitors: Significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering. *Berlin Heidelberg: Springer-Verlag*, 1-126.
- Bleeker, A.B. and Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 1-18.
- Blow, D.M., Janin, J. and Sweet, R.M. (1974) Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein-protein interactions. *Nature*, **249**, 54-57.
- Boardman, N.K. (1962) Studies on a protochlorophyll-protein complex. I. Purification and molecular-weight determination. *Biochim Biophys Acta*, **62**, 63-79.
- Boulter, D. (1993) Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry*, **34**, 1453-1466.
- Brandon, D.L. and Friedman, M. (2002) Immunoassays of soy proteins. *J Agric Food Chem*, **50**, 6635-6642.
- Brenner, E.D., Lambert, K.N., Kaloshian, I. and Williamson, V.M. (1998) Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol*, **118**, 237-247.

- Buhr, F., El Bakkouri, M., Valdez, O., Pollmann, S., Lebedev, N., Reinbothe, S. and Reinbothe, C.** (2008) Photoprotective role of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12629-12634.
- Camara, B., Hugueney, P., Bouvier, F., Kuntz, M., Monéger, R., Kwang, W.J. and Jonathan, J.** (1995) Biochemistry and Molecular Biology of Chromoplast Development. In *International Review of Cytology*: Academic Press, pp. 175-247.
- Chen, G.H., Huang, L.T., Yap, M.N., Lee, R.H., Huang, Y.J., Cheng, M.C. and Chen, S.C.** (2002) Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato. *Plant Cell Physiol*, **43**, 984-991.
- Chen, Y.H., Li, H.J., Shi, D.Q., Yuan, L., Liu, J., Sreenivasan, R., Baskar, R., Grossniklaus, U. and Yang, W.C.** (2007) The central cell plays a critical role in pollen tube guidance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 3563-3577.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. and Luan, S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **129**, 661-677.
- Cheung, A.Y., Wang, H. and Wu, H.M.** (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, **82**, 383-393.
- Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V.** (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*, **3**, 1-9.
- Chye, M., Sin, S., Xu, Z. and Yeung, E.** (2006) Serine proteinase inhibitor proteins: Exogenous and endogenous functions. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **42**, 100-108.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **16**, 735-743.
- Crawford, B.C., Ditta, G. and Yanofsky, M.F.** (2007) The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of Arabidopsis thaliana. *Curr Biol*, **17**, 1101-1108.
- Crawford, B.C. and Yanofsky, M.F.** (2008) The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. *Curr Biol*, **18**, R972-978.
- Dattagupta, J.K., Podder, A., Chakrabarti, C., Sen, U., Mukhopadhyay, D., Dutta, S.K. and Singh, M.** (1999) Refined crystal structure (2.3 Å) of a double-headed winged bean alpha-chymotrypsin inhibitor and location of its second reactive site. *Proteins*, **35**, 321-331.
- De Grauwe, L., Vandebussche, F., Tietz, O., Palme, K. and Van Der Straeten, D.** (2005) Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the Arabidopsis hypocotyl. *Plant Cell Physiol*, **46**, 827-836.
- de Oliveira, D.E., Franco, L.O., Simoens, C., Seurinck, J., Coppiniers, J., Botterman, J. and Van Montagu, M.** (1993) Inflorescence-specific genes from Arabidopsis thaliana encoding glycine-rich proteins. *Plant J*, **3**, 495-507.
- Dehesh, K. and Ryberg, M.L.** (1985) The NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase is the major protein constituent of prolamellar bodies in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, **164**, 396-399.
- Delp, G. and Palva, E.T.** (1999) A novel flower-specific Arabidopsis gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant beta-1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol*, **39**, 565-575.
- Desclos, M., Dubousset, L., Etienne, P., Le Caherec, F., Satoh, H., Bonnefoy, J., Ourry, A. and Avice, J.-C.** (2008) A Proteomic Profiling Approach to Reveal a Novel Role of Brassica napus Drought 22 kD/Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein in Young Leaves during Nitrogen Remobilization Induced by Stressful Conditions. *Plant Physiol.*, **147**, 1830-1844.

- Downing, W., Mauxion, F., Fauvarque, M., Reviron, M., Vienne, D.d., Vartanian, N. and Giraudat, J.** (1992) A Brassica napus transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *The Plant J*, **2**, 685-693.
- Drzewiecka-Matuszek, A., Skalna, A., Karocki, A., Stochel, G. and Fiedor, L.** (2005) Effects of heavy central metal on the ground and excited states of chlorophyll. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **10**, 453-462.
- D'Silva, I., Poirier, G.G. and Heath, M.C.** (1998) Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response--a form of programmed cell death. *Exp Cell Res*, **245**, 389-399.
- Dugardeyn, J., Vandenbussche, F. and Van Der Straeten, D.** (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *J Exp Bot*, **59**, 1-16.
- Eckhardt, U., Grimm, B. and Hortensteiner, S.** (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol Biol*, **56**, 1-14.
- Esen, A.** (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Anal Biochem*, **89**, 264-273.
- Ferrandiz, C., Pelaz, S. and Yanofsky, M.F.** (1999) Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 321-354.
- França, M.B., Panek, A.D. and Eleutherio, E.C.A.** (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **146**, 621-631.
- Fukuda, H.** (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol*, **44**, 245-253.
- Funk, V., Kositsup, B., Zhao, C. and Beers, E.P.** (2002) The Arabidopsis xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol*, **128**, 84-94.
- Gao, M. and Showalter, A.M.** (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J*, **19**, 321-331.
- Gazzarrini, S. and McCourt, P.** (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 387-391.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.J., Hajouj, T., Neshet, M.F., Yariv, I., Dor, C. and Bassani, M.** (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J*, **36**, 629-642.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A.** (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**, 87-96.
- Glazebrook, J.** (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis--2001 status. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 301-308.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N. and Giraudat, J.** (1995) Abscisic acid-dependent and -independent regulation of gene expression by progressive drought in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet*, **246**, 10-18.
- Green, B.R. and Kühlbrandt, W.** (1995) Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynthesis Research*, **44**, 139-148.
- Gremski, K., Ditta, G. and Yanofsky, M.F.** (2007) The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **134**, 3593-3601.
- Groszmann, M., Paicu, T. and Smyth, D.R.** (2008) Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis. *The Plant J*, **55**, 40-52.

- Grudkowska, M. and Zagdanska, B.** (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol*, **51**, 609-624.
- Gruis, D., Schulze, J. and Jung, R.** (2004) Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. *Plant Cell*, **16**, 270-290.
- Guan, Y. and Nothnagel, E.A.** (2004) Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in Arabidopsis cell cultures. *Plant Physiol*, **135**, 1346-1366.
- Guex, N. and Peitsch, M.C.** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Guiamét, J.J., Pichersky, E. and Nooden, L.D.** (1999) Mass Exodus from Senescing Soybean Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 986-992.
- Guzman, P. and Ecker, J.R.** (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, **2**, 513-523.
- Hagar, W.G. and Hiyama, T.** (1979) Characterization of the Light-induced Transient States of the Chlorophyll Proteins 668 and 743 from *Atriplex rosea*. *Plant Physiol*, **63**, 1182-1186.
- Halls, C.E., Rogers, S.W., Oufattole, M., Østergard, O., Svensson, B. and Rogers, J.C.** (2006) A Kunitz-type cysteine protease inhibitor from cauliflower and Arabidopsis. *Plant Science*, **170**, 1102-1110.
- Halls, C.E., Rogers, S.W. and Rogers, J.C.** (2005) Purification of a proaleurain maturation protease. *Plant Science*, **168**, 1267-1279.
- Haq, S.K., Atif, S.M. and Khan, R.H.** (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch Biochem Biophys*, **431**, 145-159.
- Heisler, M.G., Atkinson, A., Bylstra, Y.H., Walsh, R. and Smyth, D.R.** (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development*, **128**, 1089-1098.
- Hernandez-Nistal, J., Martin, I., Jimenez, T., Dopico, B. and Labrador, E.** (2009) Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Physiol Biochem*, **47**, 181-187.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. and Boulter, D.** (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, **330**, 160-163.
- Hirabayashi, H., Amakawa, M., Kamimura, Y., Shino, Y., Satoh, H., Itoh, S. and Tamiaki, H.** (2006) Analysis of photooxidized pigments in water-soluble chlorophyll protein complex isolated from *Chenopodium album*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **183**, 121-125.
- Horigome, D., Satoh, H., Itoh, N., Mitsunaga, K., Oonishi, I., Nakagawa, A. and Uchida, A.** (2007) Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein. *J Biol Chem*, **282**, 6525-6531.
- Horisberger, M. and Tacchini-Vonlanthen, M.** (1983) Ultrastructural localization of Bowman-Birk inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv. Maple Arrow by the gold method. *Histochemistry*, **77**, 313-321.
- Hörtensteiner, S.** (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 55-77.
- Hughes, J.L., Razeghifard, R., Logue, M., Oakley, A., Wydrzynski, T. and Krausz, E.** (2006) Magneto-Optic Spectroscopy of a Protein Tetramer Binding Two Exciton-Coupled Chlorophylls. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 3649-3658.
- Hung, C.H., Lee, M.C. and Lin, J.Y.** (1994) Inactivation of *Acacia confusa* trypsin inhibitor by site-specific mutagenesis. *FEBS Lett*, **353**, 312-314.

- Huntington, J.A.** (2006) Shape-shifting serpents--advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci*, **31**, 427-435.
- Ilami, G., Nespoulous, C., Huet, J.-C., Vartanian, N. and Pernollet, J.C.** (1997) Characterization of BnD22, a stress-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves: Phytochemistry, pp. 1-8.
- Irshad, M., Canut, H., Borderies, G., Pont-Lezica, R. and Jamet, E.** (2008) A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol*, **8**, 94.
- Jimenez, T., Martin, I., Hernandez-Nistal, J., Labrador, E. and Dopico, B.** (2008) The accumulation of a Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (TPI-2) located in cell walls is increased in wounded leaves and elongating epicotyls. *Physiol Plant*, **132**, 306-317.
- Jimenez, T., Martin, I., Labrador, E. and Dopico, B.** (2007) A chickpea Kunitz trypsin inhibitor is located in cell wall of elongating seedling organs and vascular tissue. *Planta*, **226**, 45-55.
- Jofuku, K.D. and Goldberg, R.B.** (1989) Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell*, **1**, 1079-1093.
- Joubert, F.J.** (1983) Purification and properties of the proteinase inhibitors from acacia sieberana (paperbark acacia) seed. *Phytochemistry*, **22**, 53-57.
- Kamimura, Y., Mori, T., Yamasaki, T. and Katoh, S.** (1997) Isolation, properties and a possible function of a water-soluble chlorophyll a/b-protein from brussels sprouts. *Plant Cell Physiol*, **38**, 133-138.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**, 193-195.
- Kelner, A.** (1949) Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **35**, 73-79.
- Kessler, F., Schnell, D. and Blobel, G.** (1999) Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta*, **208**, 107-113.
- Kieber, J.J.** (1997) The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 277-296.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K.** (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **129**, 175-182.
- Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y. and Arai, S.** (1990) Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzacystatin-II. *J Biol Chem*, **265**, 15832-15837.
- Kononowicz, A.K., Nelson, D.E., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.** (1992) Regulation of the Osmotin Gene Promoter. *Plant Cell*, **4**, 513-524.
- Kortt, A.A.** (1980) Isolation and properties of a chymotrypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) Dc.). *Biochim Biophys Acta*, **624**, 237-248.
- Kortt, A.A. and Jermyn, M.A.** (1981) Acacia proteinase inhibitors. Purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. *Eur J Biochem*, **115**, 551-557.
- Kortt, A.A., Strike, P.M. and De Jersey, J.** (1989) Amino acid sequence of a crystalline seed albumin (winged bean albumin-1) from *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Sequence similarity with Kunitz-type seed inhibitors and 7S storage globulins. *Eur J Biochem*, **181**, 403-408.
- Kreis, M., Forde, B.G., Rahman, S., Mifflin, B.J. and Shewry, P.R.** (1985) Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J Mol Biol*, **183**, 499-502.

- Krieger-Liszkay, A.** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **56**, 337-346.
- Kunitz, M.** (1945) Crystallization of a Trypsin Inhibitor from Soybean. *Science*, **101**, 668-669.
- Kunitz, M.** (1946) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. *J Gen Physiol*, **29**, 149-154.
- Kunitz, M.** (1947) Isolation of a Crystalline Protein Compound of Trypsin and of Soybean Trypsin-Inhibitor. *J Gen Physiol*, **30**, 311-320.
- Kuroda, M., Kiyosaki, T., Matsumoto, I., Misaka, T., Arai, S. and Abe, K.** (2001) Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 22-28.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lampl, N., Budai-Hadrian, O., Davydov, O., Joss, T.V., Harrop, S.J., Curmi, P.M., Roberts, T.H. and Fluhr, R.** (2010) Arabidopsis AtSerpin1, crystal structure and in vivo interaction with its target protease RESPONSIVE TO DESICCATION-21 (RD21). *J Biol Chem*, **285**, 13550-13560.
- Lan, L., Chen, W., Lai, Y., Suo, J., Kong, Z., Li, C., Lu, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Zhang, X., Han, B., Cheng, J. and Xue, Y.** (2004) Monitoring of gene expression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination and fertilization in rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA microarray. *Plant Mol Biol*, **54**, 471-487.
- Laskowski, M., Jr. and Kato, I.** (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*, **49**, 593-626.
- Lennon, K.A., Roy, S., Hepler, P.K. and Lord, E.M.** (1998) The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, **11**, 49-59.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M. and Ecker, J.R.** (2004) Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, **7**, 193-204.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X. and Yang, Z.** (1999) Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell*, **11**, 1731-1742.
- Li, J., Brader, G. and Palva, E.T.** (2008) Kunitz trypsin inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin b1 in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, **1**, 482-495.
- Lopez, F., Vansuyt, G., Derancourt, J., Fourcroy, P. and Casse-Delbart, F.** (1994) Identification by 2D-page analysis of salt-stress induced proteins in radish (*Raphanus sativus*). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **40**, 85-90.
- Lopez-Juez, E. and Pyke, K.A.** (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol*, **49**, 557-577.
- Major, I.T. and Constabel, C.P.** (2008) Functional Analysis of the Kunitz Trypsin Inhibitor Family in Poplar Reveals Biochemical Diversity and Multiplicity in Defense against Herbivores. *Plant Physiol*, **146**, 888-903.
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V. and Baudys, M.** (1989) Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett*, **251**, 94-98.
- Matile, P., Hörtensteiner, S. and Thomas, H.** (1999) CHLOROPHYLL DEGRADATION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**, 67-95.
- Matile, P., Schellenberg, M. and Peisker, C.** (1992) Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. *Planta*, **187**, 230-235.
- Matile, P., Schellenberg, M. and Vicentini, F.** (1997) Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta*, **201**, 96-99.
- Maubach, G., Schilling, K., Rommerskirch, W., Wenz, I., Schultz, J.E., Weber, E. and Wiederanders, B.**

- (1997) The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action. *Eur J Biochem*, **250**, 745-750.
- McGinnis, J. and Evans, R.J.** (1947) Amino Acid Deficiencies of Raw and Overheated Soybean Oil Meal for Chicks. *J. Nutr.*, **34**, 725-732.
- Momonoki, Y., Sugawara, M. and Watanabe, T.** (2002) Change in activity of soybean trypsin inhibitor by removal of C-terminal amino acid residues during seed germination. *Plant Prod Sci*, **5**, 51-57.
- Morita, M.T. and Tasaka, M.** (2004) Gravity sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 712-718.
- Mosolov, V.V. and Valueva, T.A.** (2005) Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41**, 227-246.
- Murata, T., Itoh, R. and Yakushiji, E.** (1980) Crystallization of water-soluble chlorophyll-proteins from *Lepidium virginicum*. *Biochim Biophys Acta*, **593**, 167-170.
- Murata, T., Toda, F., Uchino, K. and Yakushiji, E.** (1971) Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. Botrys (cauliflower). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **245**, 208-215.
- Nakahata, A.M., Bueno, N.R., Rocha, H.A., Franco, C.R., Chammas, R., Nakaie, C.R., Jasiulionis, M.G., Nader, H.B., Santana, L.A., Sampaio, M.U. and Oliva, M.L.** (2006) Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. *Int J Biol Macromol*, **40**, 22-29.
- Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., Munoz, F.J., Rodriguez-Lopez, M., Baroja-Fernandez, E. and Pozueta-Romero, J.** (2006) Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant Cell*, **18**, 2582-2592.
- Negreiros, A.N., Carvalho, M.M., Xavier Filho, J., Blanco-Labra, A., Shewry, P.R. and Richardson, M.** (1991) The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*, **30**, 2829-2833.
- Nelson, N. and Yocum, C.F.** (2006) STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEMS I AND II. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 521-565.
- Nishio, N. and Satoh, H.** (1997) A water-soluble chlorophyll protein in cauliflower may be identical to BnD22, a drought-induced, 22-kilodalton protein in rapeseed. *Plant Physiol*, **115**, 841-846.
- Noguchi, T., Kamimura, Y., Inoue, Y. and Itoh, S.** (1999) Photoconversion of a Water-Soluble Chlorophyll Protein from *Chenopodium Album*: Resonance Raman and Fourier Transform Infrared Study of Protein and Pigment Structures. *Plant Cell Physiol*, **40**, 305-310.
- Odani, S., Koide, T., Ono, T. and Ohnishi, K.** (1983) Structural relationship between barley (*Hordeum vulgare*) trypsin inhibitor and castor-bean (*Ricinus communis*) storage protein. *Biochem J*, **213**, 543-545.
- Ohtsuki, T., Ohshima, S. and Uchida, A.** (2007) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of water-soluble chlorophyll-binding protein from *Chenopodium album*. *Acta Crystallographica Section F*, **63**, 740-741.
- Oku, T. and Tomita, G.** (1975) The reversible photoconversion of *Chenopodium* chlorophyll protein and its control by the apoprotein structure. *Plant Cell Physiol*, **16**, 1009-1016.
- Oliva, M.L.V. and Sampaio, M.U.** (2009) Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **81**, 615-621.
- Oliva, M.L.V., Silva, M.C.C., Sallai, R.C., Brito, M.V. and Sampaio, M.U.** (2010) A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*, **In Press, Corrected Proof**.
- Ondzighi, C.A., Christopher, D.A., Cho, E.J., Chang, S.-C. and Staehelin, L.A.** (2008) Arabidopsis Protein

Disulfide Isomerase-5 Inhibits Cysteine Proteases during Trafficking to Vacuoles before Programmed Cell Death of the Endothelium in Developing Seeds. *Plant Cell*, **20**, 2205-2220.

Osborne, T.B., Mendel, L.B., Ferry, W.t.c.o.E.L. and Alfred J. Wakeman (1917) NUTRITIVE FACTORS IN ANIMAL TISSUES. I. *J Biol Chem*, **32**, 309-323.

Overmyer, K., Brosche, M. and Kangasjarvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci*, **8**, 335-342.

Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F. and Preuss, D. (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell*, **114**, 47-59.

Palanivelu, R. and Preuss, D. (2000) Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol*, **10**, 517-524.

Parthier, B. (1988) Gerontoplasts - the yellow end in the ontogenesis of chloroplasts. *Endocytobiosis Cell Res*, 163 - 190.

Peiffer, J.A., Kaushik, S., Sakai, H., Arteaga-Vazquez, M., Sanchez-Leon, N., Ghazal, H., Vielle-Calzada, J.P. and Meyers, B.C. (2008) A spatial dissection of the Arabidopsis floral transcriptome by MPSS. *BMC Plant Biol*, **8**, 43.

Penfield, S., Josse, E.M., Kannangara, R., Gilday, A.D., Halliday, K.J. and Graham, I.A. (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol*, **15**, 1998-2006.

Pollmann, S., Springer, A., Buhr, F., Lahroussi, A., Samol, I., Bonneville, J.M., Tichtinsky, G., von Wettstein, D., Reinbothe, C. and Reinbothe, S. (2007) A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2019-2023.

Radhamony, R.N. and Theg, S.M. (2006) Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends Cell Biol*, **16**, 385-387.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J. and Bateman, A. (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucl. Acids Res.*, **38**, D227-233.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P. and Barrett, A.J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*, **378**, 705-716.

Raz, V. and Ecker, J.R. (1999) Regulation of differential growth in the apical hook of Arabidopsis. *Development*, **126**, 3661-3668.

Reinbothe, C., Pollmann, S., Desvignes, C., Weigele, M., Beck, E. and Reinbothe, S. (2004) LHPP, the light-harvesting NADPH:protochlorophyllide (Pchl) oxidoreductase:Pchl complex of etiolated plants, is developmentally expressed across the barley leaf gradient. *Plant Science*, **167**, 1027-1041.

Reinbothe, C., Satoh, H., Alcaraz, J.P. and Reinbothe, S. (2004) A novel role of water-soluble chlorophyll proteins in the transitory storage of chlorophyllide. *Plant Physiol*, **134**, 1355-1365.

Reinbothe, S. and Reinbothe, C. (1996) The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur J Biochem*, **237**, 323-343.

Renger, T., Trostmann, I., Theiss, C., Madjet, M.E., Richter, M., Paulsen, H., Eichler, H.J., Knorr, A. and Renger, G. (2007) Refinement of a Structural Model of a Pigment-Protein Complex by Accurate Optical Line Shape Theory and Experiments. *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 10487-10501.

Reviron, M.P., Vartanian, N., Sallantin, M., Huet, J.C., Pernellet, J.C. and de Vienne, D. (1992) Characterization of a Novel Protein Induced by Progressive or Rapid Drought and Salinity in Brassica napus Leaves. *Plant Physiol*, **100**, 1486-1493.

Richardson, M. (1991) Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochem*, **5**, 259-305.

- Richardson, R.T., Sivashanmugam, P., Hall, S.H., Hamil, K.G., Moore, P.A., Ruben, S.M., French, F.S. and O'Rand, M.** (2001) Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene*, **270**, 93-102.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. and Weisshaar, B.** (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol*, **53**, 247-259.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J. and Barrett, A.J.** (1990) The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem J*, **266**, 869-875.
- Ryan, C.A.** (1990) Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annu Rev Phyto*, **28**, 425-449.
- Ryan, C.A.** (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 112-121.
- Sablowski, R.** (2009) Genes and functions controlled by floral organ identity genes. *Semin Cell Dev Biol*, **21**, 94-99.
- Satoh, H., Nakayama, K. and Okada, M.** (1998) Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll protein, a putative carrier of chlorophyll molecules in cauliflower. *J Biol Chem*, **273**, 30568-30575.
- Satoh, H., Uchida, A., Nakayama, K. and Okada, M.** (2001) Water-soluble chlorophyll protein in Brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein. *Plant Cell Physiol*, **42**, 906-911.
- Schmidt, K., Fufezan, C., Krieger-Liszkay, A., Satoh, H. and Paulsen, H.** (2003) Recombinant water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea* var. botrys binds various chlorophyll derivatives. *Biochemistry*, **42**, 7427-7433.
- Scutt, C.P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Ailhas, J., Kuno, N., Uchida, K., Gaude, T., Furuya, M. and Dumas, C.** (2003) The identification of candidate genes for a reverse genetic analysis of development and function in the *Arabidopsis* gynoceium. *Plant Physiol*, **132**, 653-665.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant J*, **31**, 279-292.
- Sessions, R.A. and Zambryski, P.C.** (1995) *Arabidopsis* gynoceium structure in the wild and in ettin mutants. *Development*, **121**, 1519-1532.
- Shain, Y. and Mayer, A.M.** (1965) Proteolytic Enzymes and Endogenous Trypsin Inhibitor in Germinating Lettuce Seeds. *Physiologia Plantarum*, **18**, 853-859.
- Shewry, P.R., Napier, J.A. and Tatham, A.S.** (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 945-956.
- Sin, S.-F. and Chye, M.-L.** (2004) Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta*, **219**, 1010-1022.
- Sisler, E.C., Blankenship, S.M. and Guest, M.** (1990) Competition of cyclooctenes and cyclooctadienes for ethylene binding and activity in plants. *Plant Growth Regulation*, **9**, 157-164.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**, 755-767.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E. and Levine, A.** (1999) The Involvement of

Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell*, **11**, 431-444.

Song, H.K. and Suh, S.W. (1998) Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J Mol Biol*, **275**, 347-363.

Sugiyama, K.-I. and Murata, N. (1978) Analyses of absorption and fluorescence spectra of water-soluble chlorophyll proteins, pigment System II particles and chlorophyll a in diethylether solution by the curve-fitting method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **503**, 107-119.

Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, **18**, 2051-2065.

Supuran, C.T., Scozzafava, A. and Clare, B.W. (2002) Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, **22**, 329-372.

Swanson, R., Clark, T. and Preuss, D. (2005) Expression profiling of Arabidopsis stigma tissue identifies stigma-specific genes. *Sexual Plant Reproduction*, **18**, 163-171.

Tabata, K., Itoh, S., Sugawa, M. and Nishimura, M. (1983) Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on Structure and Spectroscopic Characteristics of Water-Soluble Chlorophyll Protein Complex Isolated from Stems of *Lepidium virginicum*. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 987-994.

Takamiya, A. (1973) Distribution of photoconvertible, water-soluble chlorophyll protein complex CP668 in plants related to *Chenopodium album*. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **72**, 330-336.

Theiss, C., Trostmann, I., Andree, S., Schmitt, F.J., Renger, T., Eichler, H.J., Paulsen, H. and Renger, G. (2007) Pigment-Pigment and Pigment-Protein Interactions in Recombinant Water-Soluble Chlorophyll Proteins (WSCP) from Cauliflower. *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 13325-13335.

Trexler, M., Banyai, L. and Patthy, L. (2001) A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3705-3709.

Trexler, M., Banyai, L. and Patthy, L. (2002) Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Biol Chem*, **383**, 223-228.

Troncoso, M.F., Biron, V.A., Longhi, S.A., Retegui, L.A. and Wolfenstein-Todel, C. (2007) *Peltophorum dubium* and soybean Kunitz-type trypsin inhibitors induce human Jurkat cell apoptosis. *Int Immunopharmacol*, **7**, 625-636.

Tung, C.W., Dwyer, K.G., Nasrallah, M.E. and Nasrallah, J.B. (2005) Genome-wide identification of genes expressed in Arabidopsis pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol*, **138**, 977-989.

Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 785-799.

Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M. and Turk, V. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett*, **384**, 211-214.

Vallee, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K.W., Svensson, B. and Haser, R. (1998) Barley alpha-amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure*, **6**, 649-659.

Valueva, T.A., Revina, T.A., Kladnitskaya, G.V. and Mosolov, V.V. (1998) Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. *FEBS Lett*, **426**, 131-134.

Valueva, T.A., Revina, T.A., Kladnitskaya, G.V., Mosolov, V.V. and Mentele, P. (1999) Primary structure of a 21-kD protein from potato tubers. *Biochemistry (Mosc)*, **64**, 1258-1265.

- Vandenbussche, F. and Van Der Straeten, D.** (2004) Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals. *Trends Plant Sci*, **9**, 499-506.
- Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L. and Samuelsson, G.** (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol*, **7**, 1224-1231.
- von Heijne, G.** (1983) Patterns of Amino Acids near Signal-Sequence Cleavage Sites. *European Journal of Biochemistry*, **133**, 17-21.
- von Heijne, G.** (1985) Signal sequences : The limits of variation. *J Mol Biol*, **184**, 99-105.
- von Wettstein, D., Gough, S. and Kannangara, C.G.** (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 1039-1057.
- Wang, H., Wu, H.M. and Cheung, A.Y.** (1996) Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *Plant J*, **9**, 715-727.
- Wasternack, C.** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, **100**, 681-697.
- Weber, S.** (2005) Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim Biophys Acta*, **1707**, 1-23.
- Woeste, K.E., Ye, C. and Kieber, J.J.** (1999) Two Arabidopsis mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol*, **119**, 521-530.
- Wu, H.-m., Wong, E., Ogdahl, J. and Cheung, A.Y.** (2000) A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *The Plant J*, **22**, 165-176.
- Yakushiji, E., Uchino, K., Sugimura, Y., Shiratori, I. and Takamiya, F.** (1963) Isolation of water-soluble chlorophyll protein from the leaves of *Chenopodium album*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **75**, 293-298.
- Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2001) A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiol*, **127**, 1626-1634.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. and Shinozaki, K.** (1992) Molecular Cloning and Characterization of 9 cDNAs for Genes That Are Responsive to Desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence Analysis of One cDNA Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. *Plant Cell Physiol*, **33**, 217-224.
- Ye, X. and Bun Ng, T.** (2009) A Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor with Antiproliferative Activity from Small Glossy Black Soybeans. *Planta Med*, **75**, 550-556.
- Zadnikova, P., Petrasek, J., Marhavy, P., Raz, V., Vandenbussche, F., Ding, Z., Schwarzerova, K., Morita, M.T., Tasaka, M., Hejatko, J., Van Der Straeten, D., Friml, J. and Benkova, E.** (2010) Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **137**, 607-617.
- Zhong, D. and Zewail, A.H.** (2001) Femtosecond dynamics of flavoproteins: Charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11867-11872.

Résumé

Les protéines WSCP (*Water-soluble Chlorophyll binding Proteins*) de classe II sont des protéines solubles capables de fixer la chlorophylle et ses dérivés chez les *Brassicaceae*. Ces protéines font partie de la famille des inhibiteurs de protéases et elles présentent la particularité d'être induites en conditions de stress abiotiques à la lumière. Leurs fonctions *in planta* sont à ce jour très peu documentées. Cette thèse présente l'étude de la fonction physiologique d'une WSCP chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Nous avons montré dans un premier temps que la protéine WSCP n'est pas induite en conditions de stress pendant la photomorphogénèse. En revanche, elle est exprimée dans les plantules à l'obscurité (étiolées) et dans le tissu de transmission des fleurs, lieu de passage des tubes polliniques.

Dans la fleur, nous avons mis en évidence la régulation de WSCP par les facteurs de transcriptions HEC et NTT impliqués dans le développement floral. Par une approche de génique inverse, nous avons montré un rôle de WSCP dans le contrôle de la mort cellulaire du tissu de transmission. En conséquence, la progression des tubes polliniques est altérée et la mort cellulaire non spécifique influence le développement des graines.

Chez les plantules étiolées, le transcrit WSCP est exprimé au niveau de la crosse apicale, structure dont la fonction est de protéger les plantules au cours de l'émergence hors du sol. De manière intéressante, les facteurs NTT et HEC sont également exprimés dans les plantules étiolées mais régulent l'expression du gène WSCP de façon différente. De plus, la protéine WSCP s'accumule en présence de l'hormone de stress éthylène dans la crosse apicale et l'activité du promoteur du gène WSCP augmente en conditions de stress mécaniques. Prises ensemble, ces expériences laissent présager d'un rôle protecteur de la protéine WSCP au cours de la skotomorphogénèse.

Mots-clés : Développement floral, tissu de transmission, plantules étiolées, crosse apicale

Abstract

Class II WSCP proteins (*Water-soluble Chlorophyll binding Proteins*) are soluble proteins that interact with chlorophyll and its derivatives in *Brassicaceae*. These proteins belong to the protease inhibitor family and they are induced by abiotic stress under light conditions. To date, their functions in plants are not well documented. The aim of this study is to characterize the physiological function of a WSCP protein in model plants *Arabidopsis thaliana*.

We demonstrated initially that the WSCP protein is not induced under stress conditions during photomorphogenesis. However, the protein is expressed in dark grown (etiolated) seedlings as well as in the flower transmitting tract, the path of pollen tubes growth.

In the flower, we have demonstrated a WSCP regulation by HEC and NTT transcription factors involved in floral development. By a reverse genetic approach, we have highlighted a regulatory WSCP function in transmitting tract cell death. Consequently, the pollen tube growth is impaired and the resulting nonspecific cell death influence seed development.

In etiolated seedlings, WSCP transcript is expressed in the apical hook, a structure which protects seedlings during emergence from soil. Interestingly, HEC and NTT transcription factors are also expressed in etiolated seedlings and regulate WSCP gene expression differently. Furthermore, WSCP protein accumulates in the presence of the stress hormone ethylene in apical hook and WSCP gene promoter activity increases during mechanical wounding. Taken together, these experiments suggest a protective role of WSCP proteins during skotomorphogenesis.

Keywords : Floral development, transmitting tract, etiolated seedling, apical hook