Université Louis Pasteur

Strasbourg I

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR Domaine : Biologie Moléculaire Végétale

par

Esther GERBER

Localisation cellulaire de protéines fluorescentes isoprénylables dans des cellules de tabac BY-2

Soutenue le 22 Septembre 2005 devant la Commission d'Examen :

Thomas J. BACH Université Louis Pasteur, Strasbourg Nathalie GIGLIOLI-GUIVARC'H Université de Tours, Tours Anne-Lise HAENNI Institut Jacques Monod, Paris Francis KARST Institut National de la Recherche Agronomique, Colmar Michel ROHMER Université Louis Pasteur, Strasbourg Béatrice SATIAT-JEUNEMAITRE Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette Directeur de thèse
Examinateur
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examinateur
Rapporteur externe

A ma Maman

Je tiens à remercier B. Fritig et S. Benvéniste pour m'avoir accueillie au sein du département Métalolisme et Fonction des Isoprénoïdes chez les Végétaux de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes. Je remercie aussi T.J. Bach d'avoir été le Directeur de cette thèse. Je suis particulièrement reconnaissante à M.-A. Hartmann, A. Hemmerlin, A. Hoeft, E. Guilley, S. Darnet et L. Wentzinger pour leur aide, leurs conseils et leur soutien précieux. Merci à l'ensemble des collègues que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces années. Je remercie mes amis et ma famille pour leur présence à mes côtés.

Je tiens à remercier les membres du jury N. Giglioli-Guivarc'h, A.-L. Haenni, F. Karst, M. Rohmer et B. Satiat-Jeunemaitre pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Plan de la thèse

1. Les modifications co-traductionnel	les ou post-traductionnelles des protéines par les	
lipides de nature non isoprénique_		_2
1.1 La glypiation		_2
1.2 La N-myristoylation		_4
1.3 La S-palmitoylation		_8
- •		

2. Modification post-traductionnelle des protéines par isoprénylation	_11
2.1 Généralités	_11
2.2 Le farnésyldiphosphate (FPP) et le géranylgéranyldiphosphate (GGPP)	_12
a. Les isoprénoïdes	_13
b. Les voies de biosynthèse	_15
- La voie classique du MVA	_15
Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (Fig. I.10) :	_
16	
Biosynthèse des isoprénoïdes :	_17
- La voie du MEP	_18
Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (Fig. I.11) :	_
18	
Une nouvelle cible pour le développement d'herbicides, d'antibiotiques et de	
drogues permettant de lutter contre la malaria :	_21
- Compartimentation cellulaire et interaction des deux voies chez les plantes	
supérieures	_22
2.3 Les protéines acceptrices de groupes isoprényles	_23
a. Généralités	_23
b. Les protéines animales modifiées	_24
- La super-famille des protéines Ras	_25
- La famille des protéines Ras	
26	
c. Les protéines végétales isoprénylées	_28
2.4 Les protéines isoprényl transférases	_31
a. Généralités	_31
b. Les protéines farnésyl transférases	_
32	
c. Les protéines géranylgéranyl transférases-I	_33
d. Mécanisme catalytique des GGTases-I et FTases animales	_
34	
e. Les protéines Rab-géranylgéranyl transférases	_36
2.5 Après l'isoprénylation	_37
a. L'endoprotéolyse	_37
b. La carboxyl méthylation	_39
c. Localisation intracellulaire et réactions post-isoprénylation	_40
3. Problématique de la thèse	_40

Chapitre I

Construction d'un outil permettant la visualisation in vivo de la	
distribution de protéines isoprénylables	42

1. Choix de l'outil de travail	43
1.1 Un outil visuel : la protéine rapporteur « GFP »	
43	
a. Généralités	43
b. Caractéristiques de la GFP utilisée dans ce travail	
44	
c. Localisation intracellulaire de la GFP	44
1.2 Une protéine visuelle rendue isoprénylable	47
a. Les critères de sélection	47
b. Les calmodulines	47
- Généralités	47
- Structure, classification, expression	
49	
- Localisation intracellulaire des CaMs végétales	50
c. La calmoduline 61 de riz, OsCaM61	52
- Généralités	52
- Analyse informatique de la séquence protéique de OsCaM61	52
Analyse de la structure primaire de OsCaM61 :	53
Prédiction « <i>in silico</i> » de la distribution intracellulaire de la protéine	
OsCaM61 :	55
- Localisation <i>in vivo</i> de la protéine OsCaM61	57
1.3 Matériel biologique choisi, les cellules végétales TBY-2	57
a. Propriétés des cellules TBY-2	57
b. Mise en évidence de l'isoprénylation des protéines dans les cellules TBY-2	61
2. Première étape : construction des protéines chimères isoprénylables à partir de	
OsCaM61	64
2.1 Choix de la partie peptidique C-terminale de OsCaM61 à fusionner à la GFP	64
2.2 Clanage de l'avtrámitá C terminale de OsCaM61 et création d'une protéine de	
2.2 Cionage de l'extremite C-terminale de Oscalvior et creation d'une proteine de	65
2.3 Création d'une protéine CED farnéeulable	03 66
2.5 Création de protéines CFP contrôles non isoprénylables	00 68
2.4 Creation de proteines GFT controles non isoprenyiables	00 60
2.5 Construction à une proteine GFT modifiable par une Rab-GGTase	09
CVIL CED DRCoM CVIM CED DRCoM CCC CED DRCoM SVIL of CED	
CVIL, GFT-DDCaM-CVIN, GFT-DDCaM-CCG, GFT-DDCaM-SVIL et GFT-	60
	09
3. Expression transitoire des protéines de fusion GFP créées71	
3.1 Transformation par la technique de bombardement	71
3.2 Optimisation de la technique dans le cas des cellules TBY-2	72
a. Paramètres physiques	72

b. Paramètres biologiques	75
3.3 Expression transitoire des protéines GFP isoprénylables	_76
a. Localisation intracellulaire des protéines isoprénylables GFP-DBCaM-CVIL,	
GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CCG dans les cellules TBY-2	
// - Observations sous la loune binoculaire à fluorescence	77
- Observations au microscope à fluorescence	
- Observations au microscope confocal	
b. Localisation intracellulaire des protéines isoprénvlables GFP-DBCaM-CVIL.	
GFP-DBCaM-CVIM dans des cellules épidermiques de poireau ou d'oignon	_80
c. Localisation intracellulaire des protéines non isoprénylables GFP-DBCaM-	
SVIL et GFP-DBCaM-SVIM	_82
d. Transformation stable des TBY-2 par bombardement	_83
3.4 Discussion des résultats	_84
4 E	07
4. Expression stable des proteines d'interet	_80
nTA7001	86
4.2 Clonage des différentes constructions dans le vecteur nTA7001 et obtention de	_00
transformants stables TBY-2	88
4.3 Localisation intracellulaire des protéines GFP, GFP-DBCaM-SVIL/M et GFP-	_00
DBCaM-CVIL/M	_91
4.4 Cinétique d'expression <i>in vivo</i> des protéines de fusion GFP isoprénylables	_98
5. Localisation à la membrane plasmique des protéines GFP-DBCaM-CVIL et	100
GFP-DBCaM-CVIM	_102
5.1 I raitement des cellules transgeniques avec un detergent	104
5.2 Le marqueur FN14-04	_104
106	—
6. Suivi de la localisation <i>in vivo</i> des protéines GFP isoprénylables au cours du	
cycle cellulaire	
	111
6.1 Simple synchronisation du cycle cellulaire	_111
6.2 Etudes spatio-temporelles de la distribution intracellulaire des proteines GFP	111
6 3 La cytocinàsa et la formation de la plaque cellulaire chez les plantes supérieures	_111 122
6.4 Traitement des transformants stables à la cafféine	-122 -124
7. Un outil-test	_
127	
8 GFP-DBC 9M-CVII, et GFP-DBC 9M-CVIM, des protéines isoprénulées ?	131
	_151

Partie 1 : Transport intracellulaire des protéines GFP isoprénylables	
1. Introduction	_140
1.1 Trafic intracellulaire de protéines animales isoprénylées vers la membrane	
plasmique	140
a. Protéines Ras	140
b. Protéines G (Michaelson <i>et al.</i> , 2002)	142
1.2 Stratégie mise en place pour l'étude du transport intracellulaire d'une protéine végétale isoprénylable vers la membrane plasmique144	-
2. Les microtubules et le trafic intracellulaire des protéines de fusion GFP isoprénylables_ 2.1 Le taxol	_145 146
a Traitement des cellules au taxol	146
b. Distribution intracellulaire des différentes protéines GFP dans des cellules traitées au taxol	148
2.2 L'orvzaline	149
a. Conditions de traitement	149
b. Effets de l'oryzaline sur la localisation des protéines d'intérêt	150
2.3 Conclusion	151
3. Le système endomembranaire et les protéines isoprénylées	151
3.1 Introduction	151
3.2 Système endomembranaire et protéines Rab	153
3.3 Hypothèse d'un transport <i>via</i> une voie exocytique	154
4. Utilisation de la bréfeldine A	_156
4.1 Généralités	156
4.2 Conditions de traitement des cellules TBY-2 à la BFA	158
4.3 Observation des effets de la bréfeldine A sur le transport intracellulaire des	1/(
4.4 Hypothèse d'une révélation de « compartiments BFA »	-
4.5 Hypothèse d'une révélation de « compartiments hybrides RE-Golgi »	165
4.6 Observation des cellules en fin de cytocinèse	166
5. Implication des filaments d'actine dans le trafic intracellulaire des protéines GFP d'intérêt ? Utilisation de la cytochalasine D	_170
5.1 Conditions de traitement des transformants stables	170
5.2 Localisation intracellulaire des protéines GFP d'intérêt dans les cellules TBY-2 traitées à la cytochalasine D	_171
6. Conclusion	_173
Partie 2 : Origine des substrats isopréniques utilisés pour modifier une protéine GFP isoprénylable	-

1. Introduction	178	
2. Construction d'une nouvelle GFP farnésylable à partir de AtRop6	180	
2.1 Les protéines Rops, une sous-famille propre aux plantes	180	
2.2 Choix de la partie C-terminale à fusionner à la GFP	183	

2.3 Isolement de AtRop6, construction de protéines de fusion GFP et expression	
transitoire dans les cellules TBY-2	
2.4 Construction de la protéine de fusion GFP-AtRop6 et expression transitoire	
dans les cellules TBY-2	188
2.5 Expression stable des protéines GFP-AtRop6-CSIM et GFP-AtRop6-C/S dans	
les cellules TBY-2	190
2.6 Expériences de colocalisation de la protéine GFP-AtRop6-CSIM avec le FM [®] 4-64_	195
2.7 Conclusion	197

3. Etudes métaboliques : traitement des transformants stables par différents inhibiteurs des voies de biosynthèse______197

3.1 Introduction	_197
3.2 La mévinoline	_197
a. Propriétés pharmacologiques des statines	_198
b. Les statines sont des inhibiteurs de l'HMGR	_200
c. Conditions de traitement des cellules TBY-2 avec la mévinoline	_200
d. Effets de la MV sur la localisation intracellulaire des protéines	
GFP-DBCaM-C/S, GFP-AtRop6-C/S et GFP	_
202	
e. Effets de la MV sur la distribution intracellulaire des protéines	
GFP-DBCaM-CVIM, GFP-AtRop6-CSIM et GFP-DBCaM-CVIL	_202
f. Discussion des résultats	_204
3.3 La fosmidomycine	_205
a. Données bibliographiques	_205
b. Choix des conditions de traitement des cellules avec la FOS	_206
c. Effets de la FOS sur la localisation cellulaire des protéines de fusion GFP	_
206	• • • •
d. Discussion des résultats	_209
3.4 La kétoclomazone	_211
a. Données bibliographiques	_211
b. Conditions de traitement des cellules par la Kéto	_213
c. Effets de la Kéto sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP	
géranylgéranylable	_213
d. Discussion des résultats	_217
3.5 Inhibition des deux voies par la FOS et la MV	_218
a. Conditions de traitement	_218
D. Effets au double traitement FOS/MV sur la distribution intracellulaire des	310
proteines GFP farnesylables	_218
c. Effets du double traitement FOS/MV sur la distribution cenulaire de la	221
2 6 Inhibition des deux voies nor le Véte et le MV	221
3.0 Initipition des deux voies par la Keto et la Miv	220
5.7 Conclusions sur 1 minibition des deux voles de biosynthèse des isoprenoides	_220
1 Inhibition des doux voies de biesynthèse et réversion par un intermédiaire	
4. Infibition des deux voles de biosynthèse et reversion par un intermediane biosynthétique isoprénique	230
4 1 Effets de l'addition de mévalonate sur des cellules traitées par la FOS et par la	_230
MV	230
a Le mévalonate	$\frac{230}{230}$
h. Choix de la concentration en MVA à utiliser et conditions de traitement	231
c Effets du MVA sur la localisation <i>in vivo</i> de la protéine GFP	_201
géranylgéranylable	233
d. Discussion des résultats	234
4.2 Essais de complémentation de l'inhibition FOS/MV et FOS/Kéto par des isoprénols	235
a. Existence d'une voie de recyclage pour le farnésol et le géranylgéraniol	235
b. Incorporation du farnésol et du géranvlgéraniol dans les protéines	236
c. Les isoprénols lèvent l'effet inhibiteur des statines chez les animaux	238
A	- ·

d. Conditions de traitement des transformants stables	238
e. Réversion de l'inhibition FOS/MV par les trois isoprénols (géraniol, farnésol	220
et geranylgeraniol)	239
1. Variation de la concentration en isoprenois	
242 g. Réversion de l'inhibition Kéto/MV ner les trois isonrénals	
244	
h. Discussion des résultats	247
i. Réversion de l'inhibition MV ou FOS par les isoprénols	249
5. Conclusion générale	
253	
Conclusions et perspectives	256
Matériel et Méthodes	261
Partie 1 : LE MATERIEL	262
1. Le matériel vivant	262
1.1 Le matériel végétal : conditions de culture	262
a. Les cellules de tabac	262
b. Le tissu épidermique de poireau et d'oignon	262
c. Les plantules de riz : conditions de croissance	263
d. Les cellules de ronce	264
1.2 Le materiel bacterien : conditions de culture	264
a. Les dacteries de type ALI-diue	204
D. Les agrodacteries LBA 4404	204
2 Les antibiotiques	266
2. Les antibiotiques 2.1 Milieux de culture de plante	<u>200</u> 266
2.1 Willieux de culture pour bactéries	267
3. Le matériel génétique	268
3.1 Vecteur de clonage : pGEM [®] -T	268
3.2 Vecteur de sous clonage et d'expression transitoire : pGFP-MRC	269
3.3 Vecteur de sous clonage et d'expression stable : pTA 7001	269
3.4 Les oligonucléotides	271
3.5 Banque d'ADNc d'Arabidopsis thaliana	271
4. Les outils moléculaires	271
5. Le matériel chimique	272
5.1 Composé radioactif	272
5.2 La dexaméthasone	272
5.3 Les inhibiteurs des voies de biosynthèse des isoprénoïdes	273
5.4 Les inhibiteurs d'isoprényl transférases	276
5.5 Le mevalonate et les isoprenols	278
5.0 Les autres innibiteurs	280
5./ Les autres produits	282

6. Le matériel utilisé en biologie cellulaire	_282
6.1 Les molécules fluorescentes	282
6.2 Le canon à particules	285
6.3 La loupe binoculaire à fluorescence	285
6.4 Le microscope à fluorescence	285
6.5 Le microscope confocal	285
	•••
Partie 2 : LES METHODES	_287
1 Las móthadas hiachimiquas	
287	-
1 1 Radiomarquage à l'acide mévalonique de protéines de cellules de tabac BV-2	287
1 2 Extraction des protéines	288
1.3 Dosage des protéines par la méthode modifiée de Lowry	288
1.4 Electrophorèse monodimentionnelle en conditions dénaturantes	289
1.5 Coloration du premier gel au nitrate d'argent puis au bleu de Coomassie	291
1.6 Autoradiographie du deuxième gel	291
	_
2. Analyse informatique des séquences	_292
3. Les méthodes de biologie moléculaire	_292
3.1 Production de bactéries Escherichia coli XL1-blue compétentes et transformation	
bactérienne	_293
a. Technique du chlorure de calcium (CaCl ₂)	_
293	
- Production de bactéries compétentes	_293
- Transformation des bactéries par choc thermique	_293
b. Technique d'électroporation	_294
- Production de bactéries compétentes	_294
<u>- Transformation des bactéries par électroporation d'un vecteur d'intérêt</u>	_294
3.2 Extraction d'ADN plasmidique	_295
a. Technique de minipréparation d'ADN plasmidique	_295
<u>- Technique classique de lyse alcaline</u>	_
295	•••
<u>- Utilisation de « kits » commerciaux</u>	_296
b. Technique de midipreparation d'ADN	_296
3.3 Extraction des ARNS totaux de riz	_290
5.4 Amplification de materiel genetique par reaction de polymerisation en chaine (PCK)	207
a Dépation de DCD elessique	297
a. Reaction de l'CR classique	227
D. Mutagenese ponctuene	200
3.5 Fractionnement, nurification et quantification de matériel génétique	299
a Sénaration par électronhorèse sur gel d'agarose	299
h Flution du fragment d'intérêt	300
c. Quantification du matériel génétique	300
d Extraction par la technique phénol/chloroforme	300
e. Précipitation à l'éthanol	301
3.6 Clonage de fragments d'ADN	301
a. Digestion enzymatique	_301
b. Ligation enzymatique	_302
3.7 Séquençage d'ADN	_303
-	

4. Les méthodes de biologie cellulaire	
505	202
4.1 Mesure de la croissance de suspensions cellulaires de 1 BY-2	303
a. Mesure de la densite optique d'une suspension cellulaire : turbidimetrie	303
D. Miethode « Packed Cell volume » (P.C.V.)	303
c. Mesure du poids du culot	304
4.2 I ransformation transitoire du materiel vegetal par biolistique	304
a. Preparation des particules	
b. Preparation du materiel vegetal	
c. Bombardement	306
a. Expression transitoire des proteines d'interet	307
e. Selection des transformants et observation du materiel vegetal	
4.3 Transformation stable des cellules de tabac BY-2 par agroinfection	308
a. Production d'agrobactéries électro-compétentes	309
b. Transformation des agrobactéries par électroporation	309
c. Préparation des agrobactéries	310
d. Coculture agrobactéries/TBY-2	310
e. Sélection des transformants stables	
310	
f. Culture des transformants stables	311
4.4 Utilisation des lignées de transformants stables	311
a. Traitement des cellules transgéniques à la dexaméthasone - induction de	
la biosynthèse des protéines GFP d'intérêt	311
b. Marquage de la membrane plasmique des cellules TBY-2 avec le FM [®] 4-64	311
c. Plasmolyse des cellules	312
d. Traitement des cellules au triton	312
e. Synchronisation simple du cycle cellulaire	312
f. Traitement des cellules transgéniques avec différents composés :	
utilisation de l'outil-test	313
g. Expérience de réversion de l'inhibition par incorporation de mévalonate	
ou d'isoprénols	313
h. Mise en évidence des mitochondries des cellules TBY-2 – test de viabilité	
des cellules	313
i. Expériences de statistiques - Technique de comptage des cellules	314
j. Quantification de fluorescence	314
k. Traitement des images obtenues	315
Annexes	316

Annexe 1 : Définitions	317
Annexe 2 : Abréviations	318
Annexe 3 : Liste des oligonucléotides	326
Bibliographie	223
Coordonnées	388

Introduction

1. Les modifications co-traductionnelles ou posttraductionnelles des protéines par les lipides de nature non isoprénique

Contrairement aux mécanismes de glycosylation, phosphorylation ou clivage protéolytique, bien connus chez les animaux ou les végétaux, les modifications cotraductionnelles et post-traductionnelles telles que la glypiation, la myristoylation, la palmitoylation ou l'isoprénylation sont moins bien caractérisées. Ces modifications des protéines par les lipides sont d'une grande importance, puisqu'elles permettent de changer la localisation d'une protéine, ainsi que sa conformation et sa fonction. En effet, chaque type de lipide a des propriétés uniques, qui peuvent donner différents attributs fonctionnels à la protéine cible (pour revue, <u>Thompson et Okuyama</u>, 2000).

1.1 La glypiation

La protéine cible est modifiée par un glycolipide, le glycosylphosphatidylinositol (GPI), composé formé par un diacylglycérol, trois mannoses, une glucosamine, un inositol et une éthanolamine (**Fig. I.1-a**). Cette modification post-traductionnelle est bien connue chez les animaux et les levures où la présence de protéines à GPI a été découverte à la fin des années 1980 (Ferguson *et al.*, 1988 ; Ferguson et Williams, 1988 ; Low, 1989). Le GPI se fixe sur la protéine grâce à une liaison amide formée entre l'éthanolamine et la fonction acide d'un résidu ω situé en C-terminal de la protéine (**Fig. I.1-a**). Ce résidu ω fait partie d'une séquence signal composée de trois aminoacides (nommés ω , ω +1 et ω +2 ; **Fig. I.1-b** et c), qui est reconnue par une GPI transamidase (Udenfriend et Kodukula, 1995a, 1995b ; Tiede *et al.*, 1999 ; McConville et Menon, 2000 ; Ikezawa, 2002 ; Nagamune *et al.*, 2003). Ces trois résidus ont des caractéristiques qui sont conservées chez tous les eucaryotes (Takos *et al.*, 2000 ; **Fig. I.1-c**). La formation du complexe protéine-glycolipide a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE). C'est la partie diacylglycérol et le groupe inositol du phosphatidyl inositol qui interagissent avec la membrane (pour revue, Englund, 1993 ; **Fig. I.1-a**).



Fig. I.1: La glypiation

a. Structure du glycosylphosphatidylinositol (GPI) fixé sur une protéine arabinogalactane (AGP) de *Pyrus communis* (d'après Oxley et Bacic, 1999)

b. Séquences C-terminales de protéines possédant un signal de fixation du GPI (d'après Takos *et al.*, 2000). Un programme appelé « big-PI Plant Predictor » permet de prédire la présence d'un tel signal dans les séquences protéiques de plantes ; l'adresse est la suivante: http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/plant_server.html (Eisenhaber *et al.*, 2003)

c. Bien qu'il n'y ait pas d'homologies de séquences entre les signaux C-terminaux de fixation du GPI, certaines caractéristiques sont conservées: l'amino-acide ω , sur lequel est fixé le GPI, est soit une sérine (Ser), une asparagine (Asn), une alanine (Ala), une glycine (Gly), un acide aspartique (Asp) ou une cystéine (Cys) ; le site ω +1 ne semble pas requérir d'amino acide particulier (Gerber *et al.*, 1992) alors qu'en ω +2, seuls 4 résidus (une alanine (Ala), une glycine (Gly), une thréonine (Thr) ou une sérine (Ser)) sont trouvés communément (Udenfriend et Kodukula, 1995a, 1995b); dans la partie ω +3 à ω +10, on retrouve souvent des résidus chargés formant un domaine polaire (Furukawa *et al.*, 1997) Plus de 150 protéines distinctes modifiées par un résidu GPI sont connues chez les animaux (Low, 1989). Elles interviennent dans divers processus, tels que la transduction de signaux (Peles *et al.*, 1997 ; Trupp *et al.*, 1998), le ciblage des protéines dans des microdomaines de la membrane plasmique (Hoessli et Robinson, 1998), la réponse immunitaire (Ferguson, 1994) ou encore la reconnaissance cellule-cellule et la nutrition cellulaire (Rothberg *et al.*, 1990). Ce sont principalement des récepteurs, des enzymes hydrolytiques ou des antigènes localisés à la surface des cellules. Ainsi, la surface cellulaire du parasite protozoaire *Trypanosoma brucei*, qui cause la maladie du sommeil, est couverte de protéines à GPI (Ferguson, 2000). La voie de biosynthèse du GPI (Takeda et Kinoshita, 1995) est donc une cible potentielle pour le développement d'agents traitant de cette maladie, la glypiation étant essentielle pour la vie de ce parasite (Nagamune *et al.*, 2000 ; Lillico *et al.*, 2003).

Contrairement au domaine animal, peu d'investigations ont été réalisées chez les plantes. C'est en 1995 que Störh et coll. ont rapporté l'existence d'une protéine végétale, une nitrate réductase étudiée chez l'algue verte *Chlorella saccharophila*, liée à la membrane plasmique et pouvant être marquée par de l'éthanolamine tritiée. Une protéine animale à GPI typique est la phosphatase alcaline (AP) ; une enzyme du même type serait présente chez une plante supérieure, *Spirodela Oligorrhiza* (Morita *et al.*, 1996). Par la suite plusieurs autres protéines à GPI, liées à la membrane plasmique, ont été détectées dans des protoplastes de *Nicotiana tabacum* (Takos *et al.*, 1997). C'est lorsque l'on a découvert des protéines arabinogalactanes (AGPs) (**Fig. I.1-b**), modifiées par un GPI (Youl *et al.*, 1998 ; Svetek *et al.*, 1999), que l'on a pu, pour la première fois, déterminer la structure du GPI d'une AGP de *Pyrus communis* (Oxley et Bacic, 1999) (**Fig. I.1-a**). Cet organisme possède une AGP1 soluble, ayant un groupement GPI tronqué de sa partie lipidique, ce qui suggère que cette protéine a été détachée de la surface cellulaire par l'action d'une phosphatidylinositol phospholipase C (Oxley et Bacic, 1999), dont l'existence a été démontrée chez les animaux (Brodbeck et Bütikofer, 1994).

1.2 La N-myristoylation

Cette modification co-traductionnelle n'a été observée que chez les eucaryotes. Il s'agit de l'attachement covalent d'un acide myristique, acide gras saturé de 14 carbones, par une liaison amide stable, sur un résidu glycine localisé en N-terminal d'une protéine (**Fig. I.2**-



Fig. I.2: La N-myristoylation

a. Mécanisme conduisant à la *N*-myristoylation d'une protéine possédant une séquence consensus de 7 à 10 résidus ; la méthionine initiatrice (M) est clivée par une méthionine-amino peptidase (MAP) (1) ; la myristoyl CoA : protéine *N*-myristoyl transférase (NMT) fixe ensuite l'acide myristique sur la protéine cible (2)

b. Motifs consensus de protéines de plantes myristolylées (d'après Yalovski *et al*, 1999). Un programme de prédiction de séquences protéiques pouvant êtres myristoylées est localisé à l'adresse internet suivante: <u>http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/myristate/index.html</u> (Asn, asparagine ; Gln, glutamine ; Ser, sérine ; Thr, thréonine ; X, aminoacide indifférent)

a). La glycine (**G**) est située en position 2 d'une séquence consensus M-**G**-N-X-X-[S/T]-X-R-R. Le transfert de l'acide myristique, qui est catalysé par la myristoyl CoA : protéine *N*myristoyl transférase (NMT), nécessite l'enlèvement préalable de la méthionine initiatrice par une méthionine-amino peptidase (MAP). Des gènes et /ou protéines NMT ont été isolés et bien caractérisés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Duronio *et al.*, 1989), chez *Candida albicans* (Wiegand *et al.*, 1992), chez les cellules de mammifères (Duronio *et al.*, 1992 ; Raju *et al.*, 1994 ; Glover et Felsted, 1995), chez la *Drosophile* (Ntwasa *et al.*, 1997) et chez *Arabidopsis thaliana* (Qi *et al.*, 2000). Les séquences des protéines NMT présentent un haut degré de similarité et les résidus aminoacides requis pour l'activité catalytique sont très conservés.

Une des premières protéines marquées avec du myristate tritié a été identifiée chez l'angiosperme aquatique Spirodella oligorrhega (Mattoo et al., 1987). Plusieurs groupes de protéines végétales ont été ensuite caractérisés grâce à la présence dans leur séquence du motif consensus de myristoylation. Ce motif est trouvé chez de nombreuses protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs) (Fig. I.2-b) d'Arabidopsis (Hong et al., 1996; Hrabak et al., 1996), de maïs (Estruch et al., 1994; Saijo et al., 1997), de riz (Kawasaki et al., 1993 ; Breviario et al., 1995 ; Martin, 2000), de carotte (Suen et Choi, 1991 ; Lindzen et Choi, 1995), de pomme de terre (Raices et al., 2001) et de courgette pour laquelle la myristoylation a été démontrée (Ellard-Ivey et al., 1999). Les CDPKs sont les sérine/thréonine kinases les plus abondantes chez les plantes. On retrouve le même motif consensus dans les séquences des kinases PTO et FEN de tomate (Fig. I.2-b) (Martin et al., 1993; Martin et al., 1994), ou un motif proche, dans les séquences des protéines ATN1 et APK1 d'Arabidopsis (Fig. I.2-b) (Hirayama et Oka, 1992; Tregear et al., 1996), ainsi que dans celles des protéines calcineurines « B-like » d'Arabidopsis (Kudla et al., 1999) et dans celles des sous-unités Ga de protéines G de différentes espèces de plantes (Hooley, 1999). Un motif conduisant à la myristoylation a aussi été trouvé dans la séquence en aminoacides d'acyl-CoA synthétases, protéines impliquées dans la synthèse des acides gras chez Brassica Napus (Fulda et al., 1997), ainsi que dans la séquence des protéines codées par les gènes Dem (« Defective embryo and meritems ») de tomate (Keddie et al., 1998). Au vu des différents types de protéines porteuses du motif consensus identifiées jusqu'à présent, il semble que cette modification soit impliquée dans de très nombreux processus chez les plantes.

Différentes études ont montré que la myristoylation affecte significativement la fonction de la protéine. Cette modification est nécessaire à l'activité biologique de différentes protéines. Par exemple, la myristoylation de la sous-unité α d'une protéine G particulière augmente son affinité pour la sous-unité $\beta\gamma$ et de ce fait permet la formation du complexe

hétérotrimérique G $\alpha\beta\gamma$ (Linder *et al.*, 1991). Par ailleurs, la fixation de la protéine MARCKS (« Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate »), substrat des protéines kinases C et des tyrosines kinases de mammifères appartenant à la famille src, avec la membrane plasmique est dépendante de sa myristoylation. Cette fixation est stabilisée par l'établissement d'interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement appartenant à un domaine polybasique de la protéine et les phospholipides anioniques acides de la membrane (**Fig. I.3-a**).



Fig. I.3: Localisation intracellulaire de la protéine MARCKS (d'après Thompson et Okuyama, 2000) a. Localisation membranaire de la protéine MARCKS

b. Localisation cytoplasmique de la protéine MARCKS

(P, phosphate ; S, sérine ; G, glycine ; N, résidu non chargé ; X, aminoacide indifférent ; R, résidu basique)

La phosphorylation des sérines localisées au niveau de ce domaine polybasique entraîne un changement de conformation de la protéine ; ce mouvement provoque la solubilisation de la protéine MARCKS (**Fig. I.3-b**). Cette réaction de phosphorylation, qui est réversible, est un mécanisme de régulation de la localisation cellulaire de cette protéine (Resch, 1994 ; McLaughlin et Aderem, 1995 ; Bhatnagar et Gordon, 1997). L'association à la membrane de la protéine myristoylée peut également être stabilisée par une seconde modification post-traductionnelle telle que l'attachement d'un groupe palmitoyle ou farnésyle (Cadwallader *et al.*, 1994). Ainsi, il a été montré que la localisation membranaire d'une CDPK de riz, OsCPK2 (Martin, 2000), ou de pomme de terre, StCDPK1 (Raices, 2001), nécessite qu'elle soit à la fois myristoylée et palmitoylée (**Fig. I.5-a**). Le fait que la palmitoylation d'une protéine est une modification réversible pourrait constituer un mécanisme de régulation de sa localisation intracellulaire.

1.3 La S-palmitoylation

La S-palmitoylation est une modification post-traductionnelle catalysée par une palmitoyl-CoA : protéine S-palmitoyl transférase (PMT) (Liu *et al.*, 1996). Cette enzyme est localisée dans la membrane plasmique des cellules animales (Dunphy *et al.*, 1996). De plus, une activité PMT a été détectée au niveau de fractions provenant de l'appareil de Golgi (Dunphy *et al.*, 1996 ; McLaughlin et Denny, 1999) et de la voie endocytique (Stockli et Rohrer, 2004). Les protéines cibles sont modifiées par un acide gras saturé à 16 carbones, l'acide palmitique, fixé par une liaison thioester sur un résidu cystéine, situé souvent en N- ou C-terminal (**Fig. I.4, page 9**).

Le groupe palmitate est trouvé couramment lié à des résidus cystéines de protéines membranaires périphériques ou intégrales. La palmitoylation d'une protéine de plante a été rapportée en 1987 par Mattoo et Edelman qui ont décrit un marquage de la protéine D1 du photosystème II de *Spirodela* avec de l'acide palmitique tritié. La palmitoylation de cette protéine chloroplastique, codée par *pbsA*, a été démontrée (Mattoo et Edelman, 1987). Parmi les protéines animales palmitoylées, il faut citer la tubuline (Caron, 1997 ; Ozols et Caron, 1997), les récepteurs β adrénergiques, les protéines Ras, et certaines sous-unités α des



Fig. I.4: La S-palmitoylation : cette modification post-traductionnelle est catalysée par une palmitoyl-CoA : protéine S-palmitoyl transférase (PMT) (C, cystéine)

protéines G (Dunphy et Linder, 1998). Des homologues des sous-unités α des protéines G sont présentes chez les plantes, mais leur palmitoylation n'a pas été prouvée (Ma, 1998).

Ce processus est réversible. Il existerait, en effet, deux groupes d'enzymes catalysant respectivement l'attachement du lipide et son enlèvement. Les enzymes permettant d'enlever l'acide gras sont des palmitoyl-thioestérases (PTE) (**Fig. I.5-a**). Il en existe deux familles ; la première, est composée de protéines lysosomales impliquées dans des processus de dégradation (Verkuyse et Hofmann, 1996) ; la deuxième comporte des protéines cytosoliques (Duncan et Gilman, 1998) qui dépalmitoylent préférentiellement les protéines membranaires. La réversibilité de la réaction de palmitoylation est un mécanisme de régulation de la localisation intracellulaire des protéines cibles. En effet, il a été montré que le trafic cellulaire des protéines H-Ras et N-Ras vers leur membrane cible est différent, selon que ces protéines sont palmitoylées ou non (Goodwin *et al.*, 2005).



Fig. I.5: Une protéine cible peut être doublement modifiée par un lipide

a. Une protéine peut être myristoylée et palmitoylée ce qui accroît son hydrophobicité et permet ainsi un attachement stable à la membrane (PMT, palmitoyl-CoA : protéine S-palmitoyl transférase ; PTE, palmitoyl-thioestérase)
b. La protéine cible peut également être doublement palmitoylée (1), palmitoylée et farnésylée (2) ou posséder un domaine polybasique additionnel (3).

Dans les cellules animales et les levures, les protéines palmitoylées sont présentes dans les domaines lipidiques de la membrane plasmique (« lipid rafts »), enrichis en stérols et sphingolipides (Melkonian *et al.*, 1999). Si les protéines sont doublement palmitoylées (**Fig.**

I.5-b), elles tendent à se localiser dans les *caveolae* qui sont des invaginations vésiculaires couramment trouvées dans les membranes plasmiques animales.

On note aussi l'existence de protéines triplement palmitoylées. Par exemple la protéine animale RPE65, peut être soit soluble (sRPE65) et non palmitoylée, soit membranaire sous forme triplement palmitoylée (mRPE65); chacune de ces deux formes, membranaire et soluble, joue un rôle différent dans la cellule (Xue *et al.*, 2004). Lorsque les protéines palmitoylées sont également myristoylées, c'est la myristoylation qui a lieu en premier (**Fig. I.5-a**). Une protéine palmitoylée peut aussi être isoprénylée (**Fig. I.5-b**), ou peut posséder, dans sa séquence, un domaine polybasique additionnel (**Fig. I.5-b**).

2. Modification post-traductionnelle des protéines par isoprénylation

2.1 Généralités

L'isoprénylation ou prénylation a été découverte chez les champignons (Kamiya *et al.*, 1978). C'est une modification post-traductionnelle des protéines par un isoprénoïde, qui a lieu chez tous les eucaryotes supérieurs. Elle a été mise en évidence chez les plantes en 1993 (Swiezewska *et al.*, 1993 ; Randall *et al.*, 1993).

Il existe trois types de modifications par isoprénylation d'une protéine:

□la farnésylation, ou fixation d'une molécule de farnésyl diphosphate (FPP) □la géranylgéranylation de type I, qui entraîne la fixation d'un géranylgéranyl diphosphate (GGPP)

□la géranylgéranylation de type II qui consiste en la fixation de deux GGPP

Trois partenaires sont mis en jeu pendant la réaction (**Fig I.6**): □les molécules isopréniques, le FPP ou le GGPP (¶ **2.2**) la protéine substrat, qui présente un motif CaaX en C-terminal (¶ 2.3)
les enzymes isoprényl transférases (PTases) spécifiques de la farnésylation, de la géranylgéranylation de type I et de la géranylgéranylation de type II (¶ 2.4).



Fig I.6: Trois partenaires interviennent dans la réaction d'isoprénylation: une enzyme appelée isoprényl transférase, une protéine cible ainsi qu'un substrat isoprénique

2.2 Le farnésyldiphosphate (FPP) et le géranylgéranyldiphosphate (GGPP)

Les deux substrats isopréniques des réactions d'isoprénylation, à savoir le FPP et le GGPP, appartiennent à la grande famille des isoprénoïdes ou terpénoïdes.

a. Les isoprénoïdes

Ils sont présents dans tous les organismes vivants et sont spécialement abondants et divers chez les plantes avec plus de 30 000 composés rapportés aujourd'hui (Chappell, 1995, 2002 ; McGarvey et Croteau, 1995 ; <u>Sacchettini</u> et <u>Poulter</u>, 1997 ; Croteau *et al.*, 2000). Les isoprénoïdes forment un groupe de métabolites variés du point de vue fonctionnel et structural. Malgré leur diversité, tous les isoprénoïdes dérivent d'une unité à 5 carbones l'isopentényl diphosphate (IPP) (ou unité isoprène) et de son isomère, le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) (**Fig. I.7**). Cette grande famille est divisée en différents groupes de



Fig. I.7: Structure de l'isopentényl diphosphate (IPP), précurseur universel pour la synthèse des isoprénoïdes, et de son isomère, le diméthylallyl diphosphate (DMAPP).

molécules (hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, ...) selon le nombre d'unités à 5 carbones qui les composent (**Fig. I.8, page 14**). La molécule la plus simple est l'isoprène (**Fig. I.9**). Dans le cas des méroterpènes (par exemple, l'ubiquinone, la chlorophylle, les cytokinines ou certains alcaloïdes), une partie seulement de ces molécules dérive de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. Les protéines isoprénylées sont classées dans ce groupe de molécules.

Le 2-méthyl-1,3-butadiène ou isoprène

Fig. I.9: L'isoprène est le plus simple des isoprénoïdes: il est formé d'une unité isoprène, c'est un hémiterpène. Il est reconnu comme étant le constituant de base des terpènes par O. Wallach, prix Nobel de Chimie en 1910. L'isoprène est un composé volatile formé dans le chloroplaste à partir du diméthylallyl diphosphate (DMAPP) par l'isoprène synthase.



Fig. 1.8: La famille des isoprénoïdes est divisée en différents groupes de molécules selon le nombre d'unités à 5 carbones qui les composent

Les fonctions des isoprénoïdes sont très variées. Il s'agit, par exemple, de la constitution des membranes des eucaryotes dans le cas des stérols. D'autres sont des hormones (cytokinines, gibbérellines, brassinostéroïdes, acide abscissique), ont un rôle dans les chaînes de transport des électrons (quinones : ubiquinone, plastoquinone), sont des pigments photosynthétiques (caroténoïdes, chaîne latérale de la chlorophylle) ou des transporteurs de sucres (polyprénols), impliqués dans la synthèse des N-glycoprotéines. D'autres encore interviennent dans la signalisation (farnésol), sont des molécules de défense

(phytoalexines), ou agissent comme des agents répulsifs ou attractifs vis-à-vis des insectes. De nombreux isoprénoïdes sont des métabolites essentiels (métabolites primaires), mais la plupart d'entre eux sont des métabolites secondaires qui interviennent dans les interactions écologiques entre les plantes et leur environnement. Il est à noter que de nombreux terpénoïdes possèdent une valeur commerciale (arômes, pigments, polymères, ...).

b. Les voies de biosynthèse

La voie du mévalonate (MVA) a été établie en premier chez les animaux et la levure en 1958 par Konrad Bloch et Feodor Lynen. Pendant 40 années, il a été admis que cette voie est utilisée communément pour la biosynthèse des isoprénoïdes dans tous les organismes. Récemment, il a été établi que chez les bactéries, l'IPP est synthétisé par une voie différente de la voie classique du MVA. Elle a été identifiée grâce à des expériences de marquage chez la bactérie (Flesch et Rohmer, 1988 ; Rohmer *et al.*, 1993 ; Broers, 1994 ; Rohmer *et al.*, 1996). Cette voie a été appelée originellement voie Rohmer. Après l'identification des premières étapes de cette voie, elle est devenue voie du MEP (Méthyl Erythritol Phosphate), du nom du premier précurseur. Cette nouvelle voie a été ensuite mise en évidence chez les plantes supérieures (Schwartz, 1994 ; Schwender *et al.*, 1995, 1996 ; Knöss *et al.*, 1997 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Schwartz et Arigoni, 1999), certaines algues (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Arigoni *et al.*, 1997 ; Schwender *et al.*, 1997 ; Disch *et al.*, 1998), les cyanobactéries et les diatomées (Cvejic et Rohmer, 2000). Elle est aussi présente dans l'apicoplaste du parasite de la malaria *Plasmodium falciparum* (Jomaa *et al.*, 1999).

- La voie classique du MVA

Les découvertes de Bloch et Lynen (prix Nobel de médecine ou physiologie en 1964) concernaient le mécanisme et la régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras. Bloch montra que l'acétyl CoA est le précurseur de la biosynthèse des stéroïdes et Lynen identifia l'IPP comme étant le précurseur de tous les isoprénoïdes.

Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (Fig. I.10) :



Fig. I.10: Formation de l'isopentényl diphosphate (**IPP**) et du diméthylallyl diphosphate (**DMAPP**) via la voie du mévalonate (**MVA**) Les enzymes catalysant les réactions sont en bleu

Une des premières étapes est la production du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), molécule à 6 carbones, à partir de 3 acétyl-CoA. L'HMG-CoA est réduit en deux étapes, qui nécessitent chacune une molécule de NADPH, pour donner du MVA : il s'agit de la première molécule caractéristique et spécifique de cette voie (Bach, 1986). Cette étape est catalysée par l'HMG-CoA réductase (HMGR) et est très importante notamment dans les systèmes animaux car il s'agit d'une étape limitante de la biosynthèse du cholestérol (Goldstein et Brown, 1990). L'HMGR animale est une enzyme associée au réticulum endoplasmique (RE) (Olender et Simoni, 1992). Un seul isogène est présent chez l'homme et les animaux, alors que le génome de la levure en présente deux (Basson *et al.*, 1986). L'HMGR végétale, elle, est également localisée dans le RE (Denbow *et al.*, 1996), et résulte de l'expression de plusieurs isogènes impliqués dans des voies métaboliques différentes. Il en existe deux chez *Arabidopsis thaliana* (Enjuto *et al.*, 1994). La formation du MVA chez les plantes constitue également une étape limitante de la biosynthèse des stérols (Schaller *et al.*, 1995). Cette enzyme peut être inhibée par la mévinoline (Alberts *et al.*, 1980) (**Fig. I.10**; voir aussi Chapitre II, Partie 2).

Biosynthèse des isoprénoïdes :

La biosynthèse des isoprénoïdes est réalisée par addition successive de molécules d'IPP sur le DMAPP, élongation catalysée par des protéines prényl transférases (type I à IV). Les prényl transférases I, permettent la synthèse de prényl diphosphates à courtes chaînes tels que le farnésyl diphosphate (FPP), le géranyl diphosphate (GPP) et le géranylgéranyl diphosphate (GGPP). Le FPP et le GGPP sont deux intermédiaires centraux dans cette voie du MVA. Le FPP est le substrat de la squalène synthase, la première enzyme de la voie conduisant aux stérols. C'est aussi le substrat de la GGPP synthase, de la prényl diphosphate synthase E à longue chaîne et de la déhydrodolichol diphosphate synthase. Chez les plantes, il est le précurseur des sesquiterpènes. Il sert de donneur de groupes prényles pour la synthèse des protéines farnésylées. Le GGPP, quant à lui, sert de donneur de groupements prényles pour la synthèse des protéines géranylgéranylées. Les prényl transférases I jouent probablement un rôle important dans la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes, car elles interviennent au niveau de points de branchement vers les diverses classes de composés terpéniques.

La voie du MVA est régulée par des mécanismes de rétrocontrôle dont les médiateurs sont souvent des molécules dérivées du précurseur MVA. Ils agissent au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel sur des enzymes clé comme l'HMGR. Par exemple, le cholestérol agit sur la synthèse de l'HMGR en diminuant la transcription d'ARNm et en activant la dégradation de l'enzyme (Goldstein et Brown, 1990). Cette protéine est aussi sous contrôle d'autres molécules d'origine isoprénique ainsi que d'un mécanisme réversible de phosphorylation (Clarke et Hardie, 1990).

- La voie du MEP

Elle est absente chez les archaebactéries, les levures et les animaux qui synthétisent leurs isoprénoïdes exclusivement par la voie du MVA. Elle est présente exclusivement chez la plupart des eubactéries ainsi que chez le parasite de la malaria *Plasmodium falciparum*. Elle est présente également dans les plastes des plantes supérieures.

Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (Fig. I.11, pages 19 et 20) :

Escherichia coli, la bactérie la mieux étudiée d'un point de vue métabolique, est un système modèle puissant pour l'élucidation de la voie du MEP. Ainsi, la plupart du travail concernant la caractérisation des enzymes de la voie du MEP a été réalisé chez cet organisme qui a permis, par exemple, la résolution de la structure cristalline des enzymes déoxy xylulose phosphate réductoisomérase (DXR) (Reuter *et al.*, 2002 ; Yajima *et al.*, 2002), diphosphocytidyl méthyl érythritol synthase (CMS) (Kemp *et al.*, 2001 ; Richard *et al.*, 2001) et méthyl érythritol cyclodiphosphate synthase (MCS) (Kemp *et al.*, 2002, Richard *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2002).

La voie du MEP commence avec la formation de déoxy xylulose phosphate (DXP) à partir de glycéraldéhyde phosphate (GA 3-P) et de pyruvate grâce à la DXP synthase (DXS). La DXS, un nouveau type de transcétolase, a été clonée chez différentes plantes supérieures (Mandel *et al.*, 1996 ; Lange *et al.*, 1998 ; Bouvier *et al.*, 1998), *Chlamydomonas* (Schwender *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Sprenger *et al.*, 1997 ; Lois *et al.*, 1998) et chez *Streptomyces* (Kuzuyama *et al.*, 2000). Les séquences de DXS de plantes possèdent des peptides de transit chloroplastiques (Araki *et al.*, 2000). Il semblerait que la synthèse du DXP soit l'étape





Fig. I.11: Formation de l'isopentényl diphosphate (**IPP**) et du diméthylallyl diphosphate (**DMAPP**) *via* la voie du méthyl érythritol phosphate (**MEP**) Les enzymes catalysant les réactions sont en **bleu**

limitante de la formation des isoprénoïdes de cette voie (Harker, 1999 ; Kuzuyama *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2000 ; Estevez *et al.*, 2001). Le DXP synthétisé par cette réaction est utilisé pour la production de thiamine et de pyridoxal (Julliard et Douce, 1991).

Dans la deuxième étape, la DXP réductoisomérase (DXR) catalyse la transformation du DXP en MEP. La DXR a été clonée chez *Arabidopsis thaliana* (Schwender *et al.*, 1999) et chez la menthe *Mentha piperita* (Lange et Croteau, 1999) ainsi que chez l'eubactérie *Escherichia coli* (Takahashi *et al.*, 1998). Le MEP formé, représente un des premiers intermédiaires de cette voie. La fosmidomycine (FOS), une substance herbicide, inhibe efficacement la biosynthèse des caroténoïdes, du phytol et de l'isoprène (Zeidler *et al.*, 1998) en bloquant spécifiquement la DXR comme montré chez *Arabidopsis* (Schwender *et al.*, 1999) (Fig. I.11; voir aussi Chapitre II, Partie 2). Le MEP est converti ensuite en méthyl érythritol cyclodiphosphate (ME-cPP) grâce à trois enzymes indépendantes (la diphosphocytidyl méthyl érythritol synthase (CMT), la diphosphocytidyl méthyl érythritol kinase (CMK), et la méthyl érythritol cyclodiphosphate synthase (MECPS)) pour former l'IPP.

Les études du suivi des atomes d'hydrogène du méthyl érythritol et du déoxy xylulose (DX) marqués au deutérium chez *Escherichia coli* (Giner *et al.*, 1998 ; Charon *et al.*, 2000) ainsi que celles relatives à la stéréochimie de l'IPP isomérase et de la FPP synthase ont démontré une biosynthèse indépendante de l'IPP et du DMAPP à partir du MEP (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000a). En effet, l'absence d'expression du gène codant pour l'IPP isomérase (*idi*) n'est pas léthale (Hahn *et al.*, 1999). Des expériences d'incorporation de précurseurs radioactifs ont démontré que l'IPP et le DMAPP sont également synthétisés par une voie branchée chez les plantes (Rieder *et al.*, 2000 ; Hoeffler *et al.*, 2002). Le DMAPP donne lieu à la formation de deux intermédiaires centraux, le GPP et le GGPP. Le GPP mène à la biosynthèse des monoterpènes et le GGPP à la synthèse d'hormones (gibbérellines, acide abscissique (ABA)), de pigments photosynthétiques (chaîne latérale de la chlorophylle, caroténoïdes) ou encore de quinones (**Fig. I.12, page 22**).

Une nouvelle cible pour le développement d'herbicides, d'antibiotiques et de drogues permettant de lutter contre la malaria :

La voie du MEP est une cible idéale pour développer des herbicides, des drogues antibactériennes et anti-parasitaires (Lichtenthaler *et al.*, 2000 ; Zeidler *et al.*, 2000 ; Dubey, 2002 ; Testa et Brown, 2003 ; Rodríguez-Concepción, 2004 ; Kuntz *et al.*, 2005). En particulier, elle rend possible le développement de composés agissant sur les enzymes de la voie du MEP présente chez les agents pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Plasmodium falciparum* et donc qui n'ont pas de cibles chez l'homme ou la souris (Jomaa *et al.*, 1999). La FOS, qui bloque spécifiquement la DXR chez les plantes (Schwender *et al.*, 1999), mais aussi chez les bactéries (Kuzuyama *et al.*, 1998) et chez *Plasmodium falciparum* (Jomaa *et al.*, 1999 ; Steinbacher *et al.*, 2003), est l'inhibiteur le plus connu de la voie du MEP.
- Compartimentation cellulaire et interaction des deux voies chez les plantes supérieures

Les plantes supérieures utilisent les deux voies de biosynthèse précédemment décrites, qui sont localisées dans différents compartiments cellulaires (**Fig. I.12**) (Lichtenthaler *et al.*,



Fig. I.12: Compartimentation des voies de biosynthèse des isoprénoïdes chez les plantes supérieures: la voie du MVA est cytoplasmique et la voie du MEP plastidiale. Il existe aussi une voie mitochondriale.

Les enzymes catalysant les réactions sont en bleu (HMGR, 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ; IDI, Isopentényl diphosphate isomérase ; DXS, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase ; GPS, Géranyl diphosphate synthase ; FPS, Farnésyl diphosphate synthase ; GGPS, Géranylgéranyl diphosphate synthase ; Acétyl-CoA, Acétyl-Coenzyme A ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A ; MVA, Mévalonate ; IPP, Isopentényl diphosphate ; DMAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GPP, Géranyl diphosphate ; FPP, Farnésyl diphosphate ; GGPP, Géranyl diphosphate ; G3P, D-Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DXP, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate ; MEP, 2-*C*-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate)

1997 ; Eisenreich *et al.*, 1998, 2001 ; Lichtenthaler, 1999 ; Rohmer, 1999). La voie du MEP est plastidiale tandis que la voie du MVA est cytoplasmique. Les isoprénoïdes mitochondriaux sont synthétisés à partir de l'IPP dérivé de la voie du MVA et importé du cytosol (Lichtenthaler, 1999).

En réalité, la compartimentation des différentes voies de biosynthèse des isoprénoïdes n'est pas stricte. En effet, des échanges (« cross-talk ») entre ces différents compartiments ont été mis en évidence grâce à l'utilisation combinée de précurseurs marqués au ¹³C et d'inhibiteurs spécifiques de chacune des deux voies (Piel *et al.*, 1998 ; Kasahara *et al.*, 2002 ; Laule *et al.*, 2003 ; Hemmerlin *et al.*, 2003).

2.3 Les protéines acceptrices de groupes isoprényles

a. Généralités

Les protéines qui sont isoprénylées ont un point commun : elles possèdent à leur extrémité C-terminale un motif de type -Ca₁a₂X ; dans ce motif, C est une cystéine sur laquelle se fixe le substrat isoprénique ; elle est suivie par deux acides aminés aliphatiques : a₁ peut correspondre à n'importe quel aminoacide, alors que la position a_2 de ce motif ne tolère pas de résidu basique, acide ou aromatique ; le dernier aminoacide X peut être une leucine, une méthionine, une alanine, une sérine, une glutamine, ou une cystéine. C'est la nature de cet aminoacide X, qui est en général responsable de la reconnaissance spécifique du substrat protéique par une des isoprényl transférases (PTase) (Reiss *et al.*, 1991 ; Casey, 1991 ; Moores *et al.*, 1991 ; Yokoyama *et al.*, 1991). En effet, la protéine sera géranylgéranylée si X est une leucine (tétrapeptide -Ca₁a₂L) ; par contre, si X est une méthionine, une sérine, une alanine ou une glutamine, la protéine sera farnésylée. D'autres protéines, liant le GTP et appartenant à la famille Rab, ont deux résidus cystéine dans leur motif C-terminal (tétrapeptide -XCXC, -XXCC ou -CCXX) qui sont chacun géranylgéranylés.

b. Les protéines animales modifiées

Chez les animaux, 2% des protéines totales seraient modifiées par un résidu isoprénique (**Fig. I.13**) (Epstein *et al.*, 1991), mais peu de ces protéines ont été identifiées. Les

a. Protéines animales modifiées par la FTase

Protéines modifiées		Fonction(s) des protéines
H-Ras	CVLS	Croissance différenciation
K-Ras/A	CTIM	Croissance, différenciation
K-Ras/R	CVIM	Croissance, différenciation
N Doc	CVVM	Croissance, différenciation
	COTS	Importation des protéines dans la mitochondria, co chanerone de Hec70
Dtp4p1	CCIO	Protéine tyrosine phosphatase
PAS2 S corovision	CIIS	Activation de l'adémulul evelase
Factour a S aprovinian	CVIA	Phéromono
Pacleur a S. Cereviside	CUIN	Phéromono
Lomina A	CIVA	Composent de la membrana nucléaire
Lamine A	CNIM	Composant de la membrane nucléaire
	CIVM	Composant de la memorane nucleaire
	CRVQ	Proteine du centromere (transition G ₂ /M)
Sous-unite a, phophorylase kinase	CAMQ	Metabolisme du glycogene dans le muscle
Sous-unite a, phophorylase kinase	CQMQ	Metabolisme du glycogene dans le foie
Sous-unité β, phophorylase kinase	CLIS	Métabolisme du glycogène musculaire
Sous-unité y, transducine	CVIS	Vision
Sous-unité α , phosphodiestérase rétinienne cGMP	CCIQ	Vision
Rhodopsine kinase	CVLS	Vision
RhoE	CTVM	Régulation du cytosquelette actine
Rap2a	CNIQ	Fonction inconnue
Rheb	CSVM	Fonction inconnue
PxF	CLIM	Assemblage du peroxisome
Protéine-1 liant le guanilate induite par interféron	CTIS	Lie le GMP, le GDP et le GTP dans les macrophages

b. Protéines animales modifiées par la GGTase-I

Protéines modifiées		Fonction(s) des protéines
2',5' Oligoadénylate synthétase 1	CTIL	Croissance, différenciation et apoptose
Rap1A	CLLL	Régulation de l'adhésion cellulaire
Rap1B	CQLL	Activation de la cascade MEK-ERK
Rac1	CLLL	Sécrétion à la membrane plasmique
RalA	CCIL	Régulation du cytosquelette (actine)
Cdc42/G25K	CCIF	
RhoA	CLVL	Assemblage des fibres d'actine et sites d'adhésion focaux
RhoB	CKVL	Assemblage des fibres d'actine et sites d'adhésion focaux; transcription
		de gènes
Inositol-1,4,5-triphosphate-5-phosphatase II	CPNL	Inactivation de l'inositol triphosphate
Protéine G hétérotrimérique (sous-unité γ)	CAIL	Liée au récepteur serpentine
Sous-unité β, phosphodiestérase rétinienne cGMP	CCIL	Vision
Rap2b	CVIL	Fonction inconnue
Protéine-1 liant le guanilate induite par interféron	CNIL	Lie le GMP, le GDP et le GTP dans les macrophages

c. Protéines animales modifiées par la Rab-GGTase

Protéines modifiées		Fonction(s) des protéines
Rab2	GGCC	Trafic vésiculaire
Rab3a	DCAC	Trafic vésiculaire

Fig. I.13: Tableaux regroupant différentes protéines animales modifiées post-traductionnellement par isoprénylation (d'après Roskoski, 2003)

a. Protéines substrat de la farnésyl transférase (FTase)

b. Protéines substrat de la géranylgéranyl transférase-I (GGtase-I)

c. Protéines substrat de la géranylgéranyl transférase-II ou Rab-géranylgéranyl transférase (Rab-GGTase)

protéines géranylgéranylées sont présentes en plus grand nombre que les protéines farnésylées (Farnsworth *et al.*, 1990 ; Rilling *et al.*, 1990). La plupart de ces protéines isoprénylées jouent

un rôle de régulateur, car elles interviennent dans les voies de transduction de signaux reliées à la croissance cellulaire, la différenciation et la morphologie (pour revue, Roskoski, 2003). Ce sont en majorité des protéines régulatrices liant le GTP (**Fig. I.13**).

- La super-famille des protéines Ras

Cette super-famille comprend un large groupe de plus de 50 protéines cellulaires ; elle est divisée en 5 familles appelées Ras, Rho/Rac, Rab, Arf et Ran (Macara *et al.*, 1996), dont les membres sont classés selon des homologies de structure et de fonctions biologiques. Ces protéines sont toutes caractérisées par le fait qu'elles lient le GTP et le GDP et ont donc une activité d'hydrolyse enzymatique du GTP. Les protéines de cette super-famille sont appelées communément petites GTPases à cause de leur masse relativement faible et de leur structure monomérique, ou encore, «Ras-like » ou «Ras-related », car elles sont toutes proches des protéines importantes Ras. Elles s'associent toutes avec des membranes cellulaires, où elles exercent leur rôle régulateur. Elles sont hydrophiles et n'ont pas de segments transmembranaires. De ce fait, c'est en partie grâce aux modifications post-traductionnelles qu'elles vont subir, qu'elles pourront interagir avec les membranes. Une seule exception concerne les protéines Ran pour lesquelles aucune modification par un lipide n'est connue. Toutes les autres petites GTPases sont modifiées par l'attachement covalent d'une ou plusieurs molécule(s) lipidique(s). Cette ou ces molécule(s) lipidique(s) peut (peuvent) être un groupe prényl et/ou une chaîne palmitoyle.

Ces petites GTPases jouent des rôles essentiels en tant que « switchs » moléculaires qui contrôlent divers processus tels que l'organisation du cytosquelette, le trafic vésiculaire intracellulaire ou l'entrée dans le cycle cellulaire. Les protéines Ras sont les plus connues et les plus étudiées du fait de leurs propriétés de proto-oncogènes. En effet, il semblerait que 30% des cancers humains soient dus à des mutations de la séquence codant pour les protéines Ras (Dolence et Poulter, 1995).

- La famille des protéines Ras

Le groupe des Ras consiste en H-, K-, N-, et R-Ras. Ces protéines sont des composants majeurs dans la voie de transduction de signaux impliqués dans la division cellulaire. Pour assurer leurs fonctions et interagir avec l'ensemble des acteurs de cette voie (notamment avec les facteurs d'échanges nucléotidiques Grb2-SOS et GAP, **Fig. I.14**), ces



Fig. I.14: Les Ras sont des protéines liant le GTP, impliquées dans la régulation de signaux cellulaires La voie majeure menant à l'activation de Ras résulte de la phosphorylation de tyrosines des protéines Shc (pour « Src homology $2/\alpha$ -collagen related ») qui entraîne l'interaction des protéines Shc avec Grb2. Grb2 interagit ensuite avec SOS, le facteur d'échange de guanylnucléotide, ce qui permet la conversion de Ras de sa forme inactive (liée au GDP), en sa forme active (liée au GTP) (Rozakis-Adcock *et al.*, 1993 ; Buday et Downward, 1993). Ras ainsi activée s'associe avec Raf1, l'active, puis s'en dissocie lorsque la protéine Ras est convertie, sous l'action de GAP, en sa forme Ras-inactive (Seger et Krebs, 1995 ; Marshall, 1995). Raf1 ainsi stimulée, active à son tour les protéines MEKs (« Mitogen Activated Protein/ Extracellular-Signal Regulated Kinase » (MEK 1 et 2)). Les MEKs, possédant une activité thréonine et tyrosine kinase, phosphorylent les protéines ERKs. Les ERKs kinases ainsi phosphorylées activeront différentes protéines sen aval (facteurs de transcription). Cette voie de transduction de signal est régulée négativement par phosphorylation de la protéine SOS (Cherniack *et al.*, 1995 ; Waters *et al.*, 1995). De plus, les protéines Rap (Bokoch, 1993 ; Burgering et Bos, 1995) pourraient aussi supprimer le signal provenant de l'activation de Ras.

GTPases doivent être localisées à la membrane plasmique ; c'est aussi à ce niveau que Ras, sous sa forme active, recrute ses cibles telles que des sérines/thréonines kinases de la famille Raf (dont Raf1), qui activent la voie ERK/MAP kinase (**Fig. I.14**). La localisation cellulaire des protéines Ras dépend de la prénylation, les Ras possédant un motif CaaX menant à la

farnésylation (Hancock et Marshall, 1989). Le groupe farnésyle augmente l'hydrophobicité de la protéine ce qui favorise son association à la membrane. Cette interaction membranaire est renforcée par les étapes de protéolyse et de carboxyl méthylation ayant lieu après l'isoprénylation (**¶2.5**; **Fig. I.15**). Des signaux additionnels, situés dans la partie C-terminale



Fig. I.15: Localisation intracellulaire des protéines H-Ras et K-Ras4B (K-Ras) (d'après Seabra, 1998) Les protéines Ras synthétisées, sont farnésylées dans le cytosol (1). Elles sont ensuite protéolysées (2) puis carboxyl méthylées (3) au niveau de réticulum endoplasmique (Gutierrez *et al.*, 1989 ; Boyartchuk *et al.*, 1997). Elles trafiquent ensuite *via* une voie sécrétoire (H-Ras) (4) ou *via* une voie mettant en jeu les microtubules (K-Ras) (5) vers la membrane cible. La protéine H-Ras est palmitoylée à la membrane plasmique (6). Une autre possibilité pourrait être que H-Ras soit acylée dans le système endomembranaire. L'association de K-Ras avec la membrane plasmique est favorisée par sa région polybasique (++) (7). (**Rce1** et **Ste24**, endoprotéases ; **PCM**, prénylcystéine α -carboxyl méthyltransférase ; **FTase**, farnésyl transférase ; **PMT**, palmitoyl-CoA : protéine S-palmitoyl transférase ; **PTE**, palmitoyl-thioestérase ; **GAP** et **SOS**, protéines interagissant avec les protéines Ras (voir **Fig. I.14**))

des protéines Ras, stabilisent aussi l'association avec les membranes. Il peut s'agir soit d'une cystéine permettant l'attachement d'un groupe palmitoyle (dans le cas de H-Ras et N-Ras) (Magee et Marshall, 1999), soit d'une région polybasique proche du motif CaaX (pour K-ras4B) (Hancock *et al.*, 1990) et qui interagit avec les têtes des phospholipides anioniques de la membrane plasmique. Alors que les protéines N-Ras et H-Ras qui possèdent un motif de palmitoylation, transitent vers la membrane plasmique par une voie sécrétoire impliquant l'appareil de Golgi, la protéine K-Ras4B, suivrait une autre voie de transport, indépendante du Golgi (**Fig. I.15**; voir aussi Chapitre II, Partie 1) (Choy *et al.*, 1999).

c. Les protéines végétales isoprénylées

Il semblerait que chez les plantes seulement 1% des protéines totales soient isoprénylées (Fig. I.16-a et b). La présence de ces protéines chez les végétaux a été révélée

a. Protéines végétales modifiables par la FTase

Protéines modifiées		Fonction(s) des protéines	Organisme
ANJ1 ² APETALA1 ² (AP1) (Yalovsky <i>et al.</i> , 2000) SQUAMOSA ¹ CAULIFLOWER ¹ MADS3 ¹ Nucleosome assembly protein ¹ (NAP1) (Galichet et Gruissem, 2003) <i>Arabidopsis thaliana</i> Farnesylated protein 3 (ATFP3) AtRAC7 (Lavy <i>et al.</i> , 2002) Rac13 ¹ (Trainin <i>et al.</i> , 1996)	CAQQ CFAA CFAA CYAA CFAT CFAT CKQQ CTVM CTAA	Chaperone Transcription Facteur régulant la floraison Développement Régulation du cycle cellulaire	Homologues identifiés dans différents organismes Arabidopsis thaliana Antirrhinum majus Arabidopsis thaliana Betula Homologues identifiés dans différents organismes Arabidopsis thaliana Arabidopsis thaliana Coton

b. Protéines végétales modifiables par la GGTase-I

Protéines modifiées		Fonction(s) des protéines	Organisme
Famille des protéines Rac/Rop1	CSIL CAFL CVFL CFFL	Croissance polaire	Homologues identifiés dans différents organismes
CaM53 ² C CaM61 a AIG1 ¹ a	CTIL CVIL CSIL	Calmoduline Calmoduline Réponse aux pathogènes	Petunia Oriza sativa Arabidopsis thaliana

Fig. I.16: Tableaux regroupant différentes protéines végétales modifiées post-traductionnellement par isoprénylation (d'après Yalovsky *et al.*, 1999 ; Galichet et Gruissem, 2003)

a. Protéines substrats de la farnésyl transférase (FTase)

b. Protéines substrats de la géranylgéranyl transférase-I (GGTase-I)

¹ Prénylation confirmée *in vitro*

² Prénylation confirmée *in vivo*

grâce à l'utilisation de molécules isopréniques marquées dérivées du MVA. Randall et coll. ont montré en 1993, que les cellules de tabac en culture, traitées à la mévinoline, incorporent du FPP et GGPP tritié dans les protéines endogènes. Beaucoup de ces protéines ont une masse moléculaire similaire à celles des petites protéines de mammifères liant le GTP et des lamines nucléaires. Chez l'épinard, il a été montré que le MVA tritié peut s'incorporer dans différentes protéines (Parmryd *et al.*, 1997). La première protéine végétale, dont la prénylation a été confirmée *in vivo*, est la protéine de tabac ANJ1. La farnésylation de ANJ1 est nécessaire pour sa localisation membranaire. Il s'agit d'une protéine homologue à DnaJ, une chaperone bactérienne interagissant avec la protéine « Heat Shock » 70 (Zhu *et al.*, 1993).

Différentes protéines capables de lier un groupe farnésyle ou un groupe géranygéranyle ont été identifiées par « screening » biochimique (Biermann *et al.*, 1994) et, par la suite, le séquençage des génomes a permis de faciliter l'identification des protéines possédant un motif

CaaX. Ainsi, chez *Arabidopsis*, des recherches *in silico* ont permis d'identifier plus de 100 protéines qui seraient des substrats potentiels de protéines FTases (**Fig. I.17, page 30**) alors que seulement 50 protéines ont été identifiées chez l'homme (Roskoski, 2003). La majorité de ces protéines joue un rôle dans la régulation de processus de signalisation cellulaire dépendants du GTP, dans la régulation de la transcription, dans les réponses biotiques et abiotiques, et dans la régulation du cycle cellulaire (pour revues, Crowell, 2000 ; Galichet et Gruissem, 2003).

La réaction d'isoprénylation n'a été prouvée *in vivo* et/ou *in vitro* que pour un petit nombre de protéines (**Fig. I.16**). Les Rop sont les protéines végétales qui ont été les plus étudiées: ce sont des petites GTPases possédant un domaine hypervariable polybasique proche du motif C-terminal CaaX. On en trouve, par exemple, à l'extrémité du tube pollinique où elles interviennent dans le contrôle de la croissance (Lin *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1999). Dans ce travail, notre intérêt a porté plus particulièrement sur la protéine Rop6 d'*Arabidopsis* (Bischoff *et al.*, 2000) (Voir Chapitre II, Partie 2) ainsi que sur la protéine CaM61 de riz (Xiao *et al.*, 1999 ; Dong *et al.*, 2002), dont un homologue existe chez le pétunia (**Fig. I.16**) (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999 ; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000b) (Voir Chapitre I).

Fonction ou homologie	Séquence CaaX	Numéro d'accès
Facteurs de transcription		4+1069120
CAULTELOWER	CYAA	At1026310
SCARECROW-LIKE6 (SCL6)	CRSS	At4q00150
Protéine homéodomaine (ATML1)(At « meristem layer 1 »)	CDGA	At4g21750
Protéine liant l'ADN	CSQM	At1g64830
Protéine liant l'ARN	CGQS	A†1g51580
Protéines liant le GTP		
Rab11	CCSS	At3g46830
AtRAC7	CTAA	At4g28950
AtRAC8	CGKN	At3g48040
ATFP8	CCGQ	At3g11730
RAB1c	CCSS	A†4g17530
Régulateurs du cycle cellulaire		
NAP1-1	СКОО	At2a19480
NAP1-2	CKOO	At4g26110
NAP1-3	CKQQ	At5956950
Adaptatine	CGIA	At2g46520
Cyclophiline	CGEM	At2g38730
Modificateurs de la paroi cellulaire		
Hexosaminidase	CLAO	At1q65600
Polygalacturonase	CGSS	At1q02460
B-galactosidase	CFQS	At1972990
Xyloglucan endo-1,4-β-D-glucanase (XTR6) (« Xet-related protein 6 »)	CLAA	At4g25810
Xyloglucan endo-1,4-β-D-glucanase (TCH4) (« Touch4 »)	CLAA	A†5g57560
Hormones végétales		
Adénine isopentényltransférase	CLVA	At3q63110
Protéine de croissance indépendante de l'auxine	CKVA	At4q24530
Protéine induite par l'auxine	CIGM	At3g53250
Protéines liant des métaux		-
ATFP2	CSVM	At2a36950
ATFP3	CTVM	At5a63530
Cdl19	CSVM	A+5g03380
Autres protéines		
Homologue DnaJ	CAQQ	A†5g22060
Homologue DnaJ	CAQQ	At3g44110
Protéine peroxysomale	CCIM	At3g03490
Protéine peroxysomale	CCVM	A†5g17550
Protéine de type AIG1 (« Androgen-inducible gene 1 »)	CIIM	At4g09940
Protéine de nodulation intrinsèque majeure	CKLA	A†1g31880
Protéine ribosomale 59	CLVA	A†1g74980

Fig. I.17: Protéines potentiellement substrats des enzymes farnésyl transférases chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Galichet et Gruissem, 2003)

2.4 Les protéines isoprényl transférases

a. Généralités

Les cellules eucaryotes contiennent généralement une classe de protéine farnésyl transférases (FTases) et deux classes de protéine géranylgéranyl transférases (GGTases), les géranylgéranyl transférases de type I (GGTases-I) et les géranylgéranyl transférases de type II (GGTases-II) ou Rab-géranylgéranyl transférases (Rab-GGTases) (Zhang et Casey, 1996a ; Clarke, 1992). Ces trois enzymes hétérodimériques sont composées d'une sous-unité α et d'une sous unité β . Les sous-unités α de la FTase et de la GGTase-I sont identiques (Seabra *et al.*, 1991) alors que leurs sous-unités β sont différentes et assurent donc la spécificité de substrat. Chacune de ces trois PTases a besoin d'ions métalliques bivalents pour son activité. L'ion Zn²⁺ est coordonné par trois résidus (Asp269 β , Cys271 β et His321 β) qui sont conservés chez toutes les protéines PTases animales. Les FTases et les Rab-GGTases, ont, en plus, besoin de l'ion Mg²⁺ pour leur activité. Les FTases et les deux types de GGTases permettent la formation d'une liaison thioéther stable entre une cystéine appartenant au motif tétrapeptidique C-terminal de la protéine et un groupe isoprénoïde en C₁₅ ou C₂₀. Les isoprényl transférases sont cytosoliques (Zhang et Casey, 1996a).

Les PTases animales sont mieux étudiées que leurs homologues végétaux. Ce sont les FTases animales qui ont été les mieux caractérisées, car il a été montré que l'inactivation de ces dernières entraîne la régression de tumeurs chez la souris (Kohl *et al.*, 1995). Il s'est ainsi développé tout un domaine de recherches concernant l'inhibition des FTases, recherches qui ont permis de produire un grand nombre d'inhibiteurs (voir Chapitre I). Certains d'entre eux sont déjà utilisés en essais cliniques dans les traitements anti-cancéreux (Johnston, 2001). Bien que ces recherches se soient concentrées sur la production d'inhibiteurs de FTase, les inhibiteurs de GGTase-I se sont aussi montrés efficaces pour ralentir la progression de tumeurs (Sebti et Hamilton, 2000). La perte de fonction des PTases a des effets biologiques dramatiques chez les animaux. L'inactivation de la protéine GGTase-I, par exemple, bloque le cycle cellulaire dans la phase de transition G1 à S et conduit à l'apoptose (Vogt *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2002).

b. Les protéines farnésyl transférases

Les FTases catalysent le transfert d'un groupe farnésyle provenant du FPP sur la cystéine d'une protéine possédant un tétrapeptide CaaX dans lequel X est en général une méthionine, une sérine, une glutamine ou une alanine (**Fig. I.18-a**). Leurs sous-unités β et α sont respectivement les produits des gènes *RAM1* et *RAM2* chez *Saccharomyces cerevisiae* (He *et al.*, 1991). La structure tridimentionnelle de la FTase de mammifère a été déterminée en présence des substrat et produit, et d'inhibiteurs (Park *et al.*, 1997; Dunten *et al.*, 1998; Long *et al.*, 1998, 2000, 2001; Strickland *et al.*, 1998).



Fig. I.18-a: La réaction de farnésylation (C, cystéine ; M, méthionine ; S, sérine ; Q, glutamine ; A, alanine ; a, désigne un aminoacide du motif d'isoprénylation)

Chez les plantes, les gènes codant pour les sous-unités β (Yang *et al.*, 1993) et α (Qian *et al.*, 1996) de la FTase de pois ont été clonés. La séquence déduite en aminoacides de la sous-unité β présente un pourcentage d'identité de 48% par rapport à celle de rat et de 40% par rapport à celle de levure. La séquence en aminoacide de la sous-unité α est similaire à celle des sous-unités α de mammifère ou de levure. Les gènes codant pour les sous-unités α et/ou β de la FTase de tomate (Yalovsky *et al.*, 1997), d'*Arabidopsis* (Cutler *et al.*, 1996), d'épinard (Parmryd *et al.*, 1995) et de tabac (Zhou *et al.*, 1996) ont été clonés par la suite. Dans le cas d'une culture cellulaire de tabac, une activité FTase particulièrement élevée a été mise en évidence dans les stades précoces (Morehead *et al.*, 1995).

Un mutant du gène codant la sous-unité β de la FTase, appelé *era1 (« Enhanced Response to Abscissic acid 1 »)*, a été isolé chez *Arabidopsis* (Cutler *et al.*, 1996). Ce mutant, dans lequel l'activité FTase est perdue, est un outil fonctionnel pour l'étude du rôle du processus de farnésylation dans les voies de signalisation chez les plantes. L'analyse détaillée de ce mutant *era1*, a montré l'importance de la FTase dans des processus tels que la différenciation des méristèmes et le développement floral (Yalovsky *et al.*, 2000a). Il a également été montré que la farnésylation des protéines est un régulateur négatif dans la signalisation de l'acide abscissique (ABA) (Allen *et al.*, 2002).

c. Les protéines géranylgéranyl transférases-I

Les GGTases-I catalysent le transfert d'un groupe géranylgéranyle provenant du GGPP sur la cystéine d'un motif CaaL situé en C-terminal d'une protéine (**Fig. I.18-b**). Comme déjà mentionné, la GGTase-I est similaire en structure à la FTase. La GGTase-I possède une sousunité α identique à celle de la FTase, qui est le produit du gène *RAM2*, et une sous-unité β différente, qui est le produit du gène *CDC43* chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ohya *et al.*, 1991 ; Finegold *et al.*, 1991 ; Yokoyama *et al.*, 1991 ; Mayer *et al.*, 1992). La GGTase-I animale purifiée contient deux sous-unités α et β ayant une masse moléculaire respective de 48 et 43 kDa (Moomaw et Casey, 1992 ; Yokoyama et Gelb, 1993). La structure de la GGTase-I de mammifère a été décrite par Taylor et coll. (2003).



Fig. I.18-b: La réaction de géranylgéranylation de type I (C, cystéine ; L, leucine ; a, désigne un aminoacide du motif d'isoprénylation)

Bien qu'une activité GGTase-I ait été mise en évidence chez les plantes il y a plusieurs années (Randall *et al.*, 1993), peu de données concernant cette enzyme sont disponibles. Un gène codant la sous-unité β de cette PTase a été cloné récemment chez *Arabidopsis* (Caldelari *et al.*, 2001). Comme dans le cas de l'enzyme animale, un domaine basique (riche en lysines et arginines) situé près du motif CaaL augmente l'affinité de la GGTase-I pour son substrat protéique (James *et al.*, 1995 ; Caldelari *et al.*, 2001).

d. Mécanisme catalytique des GGTases-I et FTases animales

Les paramètres cinétiques des GGTases-I sont similaires à ceux des FTases ; dans les deux cas, la libération du produit est l'étape la plus lente de la réaction. La réaction enzymatique met en jeu deux substrats : l'isoprénoïde et la protéine. La FTase et la GGTase-I, peuvent lier un substrat en l'absence du deuxième, mais le substrat isoprénoïde est fixé par l'enzyme en premier (Furfine *et al.*, 1995). Dans la cas de la GGTase-I, en absence de l'isoprénoïde, le complexe de l'enzyme avec la protéine n'est pas stabilisé (Yokoyama *et al.*, 1995 ; Stirtan et Poulter, 1997).

Un cycle de réactions semblable a pu être proposé pour les FTases (Long *et al.*, 2002) et les GGTases-I (Taylor *et al.*, 2003). Seul le cycle réactionnel de la protéine GGTase-I sera détaillé dans la figure I.19 (page 35). Il comprend quatre stades différents qui correspondent à des complexes moléculaires distincts. La GGTase-I lie d'abord le GGPP (1) puis le motif CaaX de la protéine (2). Le diphosphate issu du GGPP est libéré. Un changement conformationnel du groupe géranylgéranyle, qui repositionne la molécule pour permettre la catalyse, s'effectue ensuite (3) ; la conformation du peptide CaaX dans le site actif de l'enzyme reste inchangée. Le complexe protéine-isoprénoïde est alors formé. L'arrivée d'une nouvelle molécule de GGPP entraîne un transfert du produit de réaction (protéine géranylgéranylée) du site actif vers le site de sortie (4). Seul cette nouvelle molécule de GGPP peut déplacer le produit prényl-peptide du site actif et non le FPP. La libération dans le cytosol de la protéine isoprénylée est facilitée par son interaction avec l'endoprotéase (¶2.5) et par l'arrivée de la protéine substrat suivante.

La différence entre les GGTases-I et les FTases repose sur leur spécificité de substrat (isoprénoïde et protéine fixés). Les résidus déterminant la spécificité du substrat



Fig. I.19: Cycle de réactions catalysées par la protéine géranylgéranyl transférase de type I: quatre complexes (**1-4**) sont formés lors de la réaction catalysée par la protéine GGTase-I (d'après Taylor *et al.*, 2003) (*GGPP*, géranylgéranyldiphosphate ; *GGTase-I*, géranylgéranyl transférase de type I ; Rce1 ou Ste24, endoprotéases qui catalysent la réaction de protéolyse, voir ¶2.5)

isoprénoïde, dans le cas de la GGTase-I, sont la Thr49 β et la Phe324 β ; ils sont identiques chez toutes les protéines Rab-GGTases. Il existe une complémentarité de surface entre le

résidu terminal X (de la protéine) et celle de la « poche » spécifique (de l'enzyme) dans laquelle la chaîne latérale de X se fixe. Le volume de cette « poche » est plus restreint dans le cas de la GGTase-I, pour laquelle le résidu X reconnu est une leucine.

Bien que la FTase et la GGTase-I aient une haute affinité pour leurs substrats respectifs, il existe une spécificité croisée. En effet, il a été montré pour certaines protéines animales et végétales qu'elles peuvent être farnésylées mais aussi géranylgéranylées. Ainsi, dans le cas de la protéine K-Ras4B qui est farnésylée, la réaction de géranylgéranylation par une GGTase-I est possible grâce à la présence d'une séquence polybasique en C-terminal (James *et al.*, 1995). Il a été montré, chez les plantes, que la GGTase-I est capable de catalyser la géranylgéranylation de la CaM53, mais que cette protéine-CTIL peut aussi être farnésylée (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999).

e. Les protéines Rab-géranylgéranyl transférases

Les Rab-GGTases ou GGTases-II modifient exclusivement les protéines Rab (Seabra, 1998) en transférant un groupement géranylgéranyle provenant du GGPP sur chacune des cystéines des motifs XCXC, XXCC, ou CCXX situés en C-terminal (**Fig. I.18-c**) (Farnsworth



Fig. I.18-c: La réaction de géranylgéranylation de type II (C, cystéine ; X, désigne un aminoacide du motif d'isoprénylation)

et al., 1994 ; Thoma *et al.*, 2001). A la différence des Rab-GGTases de mammifère et de levure (Khosravi-Far *et al.*, 1991 ; Seabra *et al.* 1992a, 1992b), les enzymes de plantes sont capables en plus de modifier les cystéines de protéines Rab possédant un motif carboxy-terminal XCCX (Loraine *et al.*, 1996 ; Yalovsky *et al.*, 1996).

Les Rab-GGTases sont des enzymes hétérodimériques, qui ont des sous-unités α et β (produits des gènes BET4 et BET2 chez Saccharomyces cerevisiae) similaires à celles trouvées chez les FTases et les GGTases-I. A la différence des deux autres PTases, les Rab-GGTases ont besoin en plus d'une protéine escorte (REP, « Rab Escort Protein »), codée par le gène MSI4/MRS6 chez Saccharomyces cerevisiae (Andres et al., 1993). La structure de la Rab-GGTase animale a été déterminée par Zhang et coll. en 2000. Il existe un haut degré de similarité de structure au niveau des sites actifs de la GGTase-I et de la Rab-GGTase. En effet, les 24 résidus qui interagissent avec le GGPP sont conservés pour les deux classes d'enzymes. Des études biochimiques ont montré que la Rab-GGTase lie seulement un GGPP à la fois (Desnoyers et Seabra, 1998; Thoma et al., 2000). Les résidus Thr49ß et Phe324ß, identifiés chez la GGTase-I comme intervenant dans la spécificité de substrat isoprénique, sont aussi présents chez la Rab-GGTase, ce qui suggère un mécanisme similaire pour la sélection de l'isoprénoïde. Par contre, la sélection du substrat protéique par la Rab-GGTase est différente de celle de la GGTase-I, car il existe des variations au niveau des motifs C-terminaux reconnus. De plus, il semblerait que la protéine REP puisse aussi contribuer à la spécificité de la réaction.

2.5 Après l'isoprénylation...

Après avoir été isoprénylées, les protéines, à l'exception de certaines Rab (Wei *et al.*, 1992), subissent deux modifications enzymatiques successives : l'endoprotéolyse puis la carboxyl méthylation (**Fig. I.20, page 38**).

a. L'endoprotéolyse

Le motif CaaX est l'un des déterminants majeurs dirigeant les protéines nouvellement isoprénylées vers l'étape suivante d'endoprotéolyse (Choy et al., 1999), qui correspond au

clivage des trois derniers aminoacides -aaX de la plupart des protéines CaaX, dont les protéines Ras et Rho (**Fig. I.20**) (Hancock *et al.*, 1991a ; Hancock et Hall, 1993 ; Farh *et al.*,



Fig. I.20: Schématisation des réactions d'endoprotéolyse (2) et de carboxyl méthylation (3) ayant lieues au niveau du réticulum endoplasmique après l'isoprénylation (1)
 (PTase, isoprényl transférase ; Rce1, endoprotéase spécifique des prénylprotéines ; PCM, protéine prénylcystéine α-carboxyl méthyltransférase).

1995). Cette réaction est catalysée par une endoprotéase spécifique des protéines prénylées. Elle est assurée par l'une des deux métalloprotéases à zinc appelées Rce1 et Ste24 (Afc1) identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Boyartchuk *et al.*, 1997 ; Schmidt *et al.*, 1998 ; Tam *et al.*, 1998) et chez les mammifères (Tam *et al.*, 1998 ; Freije *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 1999 ; Otto *et al.*, 1999). Ces deux protéases ont des spécificités de substrat distinctes mais croisées (Trueblood *et al.*, 2000). Chez les plantes, une CaaX protéase, AtSte24, un homologue structural et fonctionnel de la protéine Ste24 de levure, a été clonée et caractérisée récemment (Bracha *et al.*, 2002)

Ces protéases sont des enzymes membranaires intégrales. Chez la levure et les mammifères, les CaaX protéases sont localisées dans le RE (Boyartchuk *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1998) et la réaction a lieu sur la surface cytosolique du RE (Schmidt *et al.*, 1998). Des études de localisation intracellulaire suggèrent que la protéase végétale AtSte24 est localisée également dans le RE (Bracha *et al.*, 2002).

Le groupe carboxylate de l'isoprényl-cystéine nouvellement formé à l'extrémité Cterminale de la protéine est ensuite méthylé.

b. La carboxyl méthylation

La protéolyse du peptide -aaX est une réaction prérequise pour la méthylation. L'enzyme catalysant la formation du méthyl ester sur le groupement carboxyl-terminal de la cystéine est la protéine prénylcystéine *a*-carboxyl méthyltransférase (PCM) (**Fig. I.20**). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette enzyme est codée par le gène *Stel4* (Hrycyna et Clarke, 1990 ; Hrycyna *et al.*, 1991 ; Sapperstein *et al.*, 1994). Une activité PCM, qui agit à la fois sur les farnésylcystéines et géranylgéranylcystéines, a été détectée, pour la première fois, dans des extraits protéiques de plantes par Crowell et coll. (1998). Un gène codant une PCM végétale a ensuite été cloné chez *Arabidopsis* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000b). L'expression fonctionnelle de la PCM végétale a été réalisée chez la levure et chez *Arabidopsis* (Crowell et Kennedy, 2001 ; Chary *et al.*, 2002).

L'enzyme Ste14 de levure, qui possède des domaines transmembranaires multiples (Sapperstein *et al.*, 1994), réside dans le RE (Romano *et al.*, 1998). La PCM de mammifère est aussi localisée dans le RE (Dai *et al.*, 1998).

La carboxyl méthylation est la seule étape potentiellement réversible des trois modifications (isoprénylation, protéolyse et carboxyl méthylation) ayant lieu en C-terminal d'une protéine substrat. Cette étape ultime pourrait donc réguler de façon dynamique la localisation intracellulaire et la fonction de la protéine (Ashby, 1998 ; Glomset et Farnsworth, 1994 ; Rando, 1996).

c. Localisation intracellulaire et réactions post-isoprénylation

La protéolyse et/ou la carboxyl méthylation peuvent intervenir dans la localisation intracellulaire des protéines cibles, mais leur contribution respective reste peu connue. Chez les animaux, il a été montré, que l'endoprotéolyse et la carboxyl méthylation influencent l'association de K-Ras avec les microtubules (Chen et al., 2000). Il s'agit là de la première démonstration d'une conséquence fonctionnelle de la protéolyse et de la méthylation de Ras. Ces réactions sont toutes deux nécessaires pour une localisation correcte de Ras mais pas des GTPases Rho (Michaelson et al., 2005). Chez les plantes, il a été montré que la réaction de carboxyl méthylation est nécessaire pour une localisation correcte de la calmoduline PhCaM53 à la membrane plasmique (Rodríguez-Concepción et al., 2000b). La carboxyl méthylation a pour effet de neutraliser les charges négatives du groupe carboxylate situé en Cterminal après protéolyse, ce qui rend le complexe plus hydrophobe ; l'interaction des protéines prénylées avec les membranes est alors stabilisée ; ceci est d'autant plus important pour les protéines farnésylées, modifiées par un résidu en C₁₅ (Rando, 1996). La réversibilité de la réaction de méthylation pourrait jouer un rôle régulateur dans les cellules (Zhang et Casey, 1996a). La déméthylation du complexe formé par les sous-unités protéiques by de la protéine G, affaiblit l'association de l'hétérotrimère avec la membrane plasmique, ce qui le rend moins efficace pour l'activation d'un effecteur en aval, la phospholipase C (Parish et al., 1995) (voir Chapitre II, Partie 1, Fig. 21.2).

3. Problématique de la thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général d'une étude de l'isoprénylation des protéines chez les plantes supérieures, un processus fondamental qui implique l'attachement covalent de résidus isopréniques en C_{15} (farnésyl) ou C_{20} (géranylgéranyl) sur une cystéine appartenant à un motif de type CaaX en position C-terminale. Ces protéines jouent un rôle important dans les voies de signalisation et de trafic vésiculaire. Leurs fonctions dépendent

étroitement de leur localisation cellulaire. Très peu de données concernent ces protéines dans le règne végétal.

Le but de ce travail a été de construire un outil expérimental permettant de visualiser, dans des cellules végétales, l'isoprénylation de protéines chimères porteuses d'un motif CaaX, pouvant donc servir d'accepteur à un résidu farnésyle ou bien à un résidu géranygéranyle ou bien encore à deux résidus géranylgéranyles. Ce travail a été réalisé en utilisant, comme matériel végétal, des cellules de tabac BY-2, caractérisées par un cycle cellulaire court et donc très actives métaboliquement.

Dans ce mémoire de thèse, le Chapitre I est consacré à la description de l'outil expérimental que nous avons construit. Dans cette partie, nous présentons les choix qui ont été faits concernant les protéines chimères servant d'accepteurs de résidus isoprényles et les différents paramètres expérimentaux qu'il a fallu optimiser, afin d'obtenir de bonnes conditions d'expression et d'observation de ces protéines. Ces protéines ont été exprimées soit de façon transitoire, soit de façon stable.

Le Chapitre II du mémoire comprend deux parties. La première correspond à une étude du transport intracellulaire des protéines chimères, isoprénylées ou non. Nous présentons les résultats obtenus en utilisant des composés qui interfèrent avec le cytosquelette (microtubules et filaments d'actine) ou bien avec le trafic vésiculaire (bréfeldine A). La seconde partie est consacrée à la détermination de l'origine métabolique des substrats isopréniques (FPP et GGPP) nécessaires à l'isoprénylation des protéines. Les plantes se distinguent, en effet, des animaux et des levures, par le fait qu'elles possèdent deux voies distinctes de biosynthèse des isoprénoïdes, la voie du MVA et celle du MEP, localisées, respectivement, dans le cytoplasme et dans les plastes. Cette étude a été menée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des deux voies (mévinoline, fosmidomycine et kétoclomazone) et d'intermédiaires ou dérivés biosynthétiques (MVA, farnésol, géraniol et géranygéraniol), susceptibles de contrer les effets inhibiteurs. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article soumis à publication dans la revue : « Journal of Biological Chemistry » (se référer à la partie « Publication et Revues » située à la fin du manuscrit). Chapitre I

Construction d'un outil permettant la visualisation in vivo de la distribution de protéines isoprénylables

1. Choix de l'outil de travail

Par définition, un outil est un instrument permettant de travailler une matière. Dans le cadre de ce travail, l'outil est défini comme un instrument biologique à construire et destiné à répondre aux questions posées dans le cadre de cette thèse. Les composantes de l'outil sont au nombre de trois. Il s'agit d'un **rapporteur** permettant la visualisation d'une **protéine isoprénylable** *in vivo*, c'est-à-dire dans un **matériel végétal** donné. Chacune de ces composantes doit répondre à différents critères qui seront traités dans les paragraphes à venir.

1.1 Un outil visuel : la protéine rapporteur « GFP »

a. Généralités

La GFP (« Green Fluorescent Protein », protéine verte fluorescente) est la première protéine fluorescente, de couleur verte, identifiée dans une petite méduse commune des eaux du Pacifique Nord, *Aequorea victoria* (Morise *et al.*, 1974) ; le gène correspondant a été cloné deux décades plus tard (Prasher *et al.*, 1992) et sa structure moléculaire a été déterminée en 1996 (Yang *et al.*, 1996a ; Ormo *et al.*, 1996). Elle fait partie, d'une famille de protéines fluorescentes (pour revue, Matz *et al.*, 2002) présentant une diversité de caractéristiques (dérivés fluorescents bleu, jaune ou rouge), qui offrent de très nombreuses applications. Ces protéines sont des autocatalyseurs, en effet, leur propre chaîne polypeptidique sert à la fois de substrat et d'enzyme pour la synthèse du pigment appelé chromophore qui est attaché covalemment à la protéine (Barondeau *et al.*, 2005). L'oxygène moléculaire est le seul agent externe requis pour la cyclisation et l'oxydation de la séquence du chromophore (Sérine65-Tyrosine66-Glycine67 dans le cas de la GFP) (Heim *et al.*, 1994). Ainsi, l'expression du gène codant la protéine GFP conduit directement à la synthèse de la protéine mature dont la

localisation peut être visualisée directement après excitation à une longueur d'onde donnée. Lorsque sa séquence est fusionnée génétiquement à celle du gène d'intérêt, elle peut être utilisée en tant que rapporteur d'expression de ce gène (Chalfie *et al.*, 1994). Il est ainsi possible d'obtenir des protéines chimères stables qui conservent généralement leur activité biologique et les propriétés de fluorescence de la GFP (Chalfie *et al.*, 1994 ; Stearns, 1995 ; Von Arnim *et al.*, 1998 ; Wang et Hazelrigg, 1994) ce qui permet d'observer leur localisation en temps réel dans les cellules vivantes. En outre, la GFP présente l'avantage d'être une protéine stable (très résistante à la protéolyse, à de nombreux agents dénaturants et à des températures élevées).

b. Caractéristiques de la GFP utilisée dans ce travail

Cette protéine, hydrophile et soluble, peut être exprimée dans de nombreux systèmes hétérologues. Au cours de ce travail, nous avons utilisé une GFP de synthèse ou sGFP de 257 aminoacides (Chiu *et al.*, 1996). Il s'agit d'un variant « codon optimisé » de la GFP sauvage (Haas *et al.*, 1996), qui possède en plus, dans son chromophore, une thréonine à la place de la sérine en position 65 (S65T) (Heim *et al.*, 1995 ; Chiu *et al.*, 1996). La sGFP ainsi modifiée présente un spectre d'excitation unique, avec un maximum à 488 nm, ce qui permet de l'exciter avec un laser argon, couramment utilisé en microscopie confocale, en maintenant l'émission de fluorescence dans le vert. Dans les cellules végétales (maïs, tabac, oignon et *Arabidopsis*), la formation du chromophore de la sGFP est plus rapide et l'émission de fluorescence est plus intense (Chiu *et al.*, 1996). La séquence de la sGFP a été placée sous le contrôle de deux promoteurs 35S, pour donner le vecteur pGFP-MRC (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999) (**Fig.** MM.**5-a**). Ce vecteur possède un site de clonage multiple en C-terminal de la protéine fluorescente permettant la construction de chimères. Par la suite, nous emploierons le diminutif « GFP » pour désigner la « sGFP ».

c. Localisation intracellulaire de la GFP

Les cellules de tabac *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 (TBY-2) ont été transformées transitoirement, par bombardement, avec le vecteur pGFP-MRC, comme indiqué dans la

partie expérimentale. Au bout de 16 à 20 heures d'expression, la protéine GFP dans tous les cas, se localise dans le cytosol cellulaire ainsi que dans le nucléoplasme (Fig. 1.1).



Fig. 1.1 : Expression transitoire de la protéine GFP dans une cellule de tabac BY-2 La cellule végétale a été observée en microscopie confocale (objectif x63) après avoir été transformée par bombardement avec le vecteur pGFP-MRC

(Col, cytosol; Na, nucléoplasme)

Lorsqu'elle est exprimée stablement, après agroinfection des cellules TBY-2 avec le vecteur pTA 7001 contenant la séquence codante de la GFP, la distribution intracellulaire reste inchangée (Fig. 1.2, page 46). Environ 1/3 de l'intensité de fluorescence émise par la GFP est présente dans le cytosol cellulaire (Fig. 1.2 et 1.3) et les 2/3 restant dans le nucléoplasme (Fig. 1.2-c et Fig. 1.3, page 47).

Cette localisation nucléaire résulte probablement d'une diffusion passive de la GFP à travers l'enveloppe nucléaire. En effet, sa masse moléculaire apparente de 28 kDa lui permet de traverser les pores nucléaires dont la limite d'exclusion est estimée à 40-60 kDa (Görlich et Mattaj, 1996). De plus, l'analyse informatique de la séquence peptidique de la GFP par un programme spécialisé dans la recherche des signaux de localisation nucléaire appelé PredictNLS (Cokol et al., 2000; http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl), n'a pas permis de trouver de motif d'import nucléaire (NLS, « Nuclear Localization Signal »).



Fig. 1.2 : Cellule de tabac BY-2 transformée stablement avec le vecteur pTA-GFP (Fig. MM.18) et exprimant la protéine GFP après 15 heures d'induction à la dexaméthasone 10 μM: la protéine GFP se localise dans le cytosol et le nucléoplasme cellulaire.
(a.) Coupes réalisées au niveau du noyau ou du cytoplasme cortical d'une cellule TBY-2, observée en fluorescence ou en DIC; vue intercellulaire (b.), nucléaire (c.), ou agrandissement du cytoplasme cortical (d.) en fluorescence et DIC.
(Photos de microscopie confocale, objectif x63; Col, cytosol; Na, nucléoplasme; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski; les points de repères sont en rose)



Fig. 1.3: Répartition intracellulaire de la fluorescence verte de la protéine GFP (en % de fluorescence): graphique présentant la moyenne des calculs d'intensité de fluorescence réalisés sur 7 cellules TBY-2 différentes exprimant stablement la protéine GFP après 15 heures d'induction à la dexaméthasone 10 µM. Le niveau de fluorescence est quantifié pour chaque structure intra-cellulaire (Vacuole (V), Membrane Plasmique (MP), Noyau (N) et Cytoplasme (Ca)) grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Etats-Unis, http://rsb.info.nih.gov/ij/).

1.2 Une protéine visuelle rendue isoprénylable

a. Les critères de sélection

La protéine ou le peptide qui va être fusionné génétiquement à la GFP doit répondre à plusieurs critères :

1) il doit contenir un motif d'isoprénylation (farnésylation ou géranylgéranylation)

2) sa séquence doit comporter au moins les éléments structuraux nécessaires pour la réaction d'isoprénylation (CaaX et domaine basique)

3) son isoprénylation doit s'accompagner de préférence d'un changement de localisation intracellulaire, permettant ainsi de visualiser directement le statut de prénylation de la protéine de fusion.

Dans ce contexte, la calmoduline 61 de riz, qui possède à la fois un domaine basique et un motif CaaX, est apparue comme une protéine modèle intéressante.

b. Les calmodulines

- Généralités

Chez les plantes, différents types de stimuli environnementaux (lumière, température, sécheresse, stimulation mécanique, infection par des pathogènes), hormonaux ou

développementaux, sont associés à des influx rapides du messager universel qu'est le calcium (Ca²⁺) (pour revue, White et Broadley, 2003). Il en résulte des changements transitoires, spatio-temporels, de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire. Ces informations spécifiques, appelées « signature calcique » (McAinsh *et al.*, 1992; pour revue, Scrase-Field et Knight, 2003), sont détectées par des récepteurs primaires liant le Ca²⁺ et appartenant aux familles des CBLs (protéines du type calcineurine B, « calcineurin B-like proteins » (Kudla *et al.*, 1999 ; Luan *et al.*, 2002)), des CDPKs (protéines kinase dépendantes du calcium, « calcium-dependent protein kinases » (Harmon *et al.*, 2000 ; Cheng *et al.*, 2002)), ou à celle des CaMs (calmodulines, « calmodulins » (pour revue, Zielinski, 1998 ; Luan *et al.*, 2002)).

Les CaMs perçoivent et transmettent le message calcique (pour revues, Snedden et Fromm, 1998, 2001) en interagissant avec des protéines en aval (facteurs de transcription, protéines kinases, enzymes, canaux ioniques, protéines associées au cytosquelette,...) (**Fig. 1.4**).



Fig. 1.4: Schéma présentant différentes réponses cellulaires engendrées par des stimuli extracellulaires et médiées par l'interaction du calcium (Ca^{2+}) avec la calmoduline (CaM) chez les plantes (d'après Yang et Poovaiah, 2003 ; les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs, « calcium-dependent protein kinases (Harmon *et al.*, 2000 ; Cheng *et al.*, 2002)), les protéines du type calcineurine B (CBLs, « calcineurin B-like proteins » (Luan *et al.*, 2002)) et les calmodulines (CaMs, « calmodulins ») sont trois classes majeures de récepteurs calciques « EF-Hand » caractérisés chez les plantes.

(CGCG, protéine liant l'ADN (« DNA-binding protein ») (Yang et Poovaiah, 2002) ; CCaMK, protéine kinase régulée par le complexe Ca²⁺/CaM (Sathyanarayanan *et al.*, 2000) ; catalase (Yang et Poovaiah, 2002b) ; Ca²⁺-ATPases, calcium-ATPase vacuolaire (Malmstrom *et al.*, 2000), du réticulum endoplasmique (Hong *et al.*, 1999) ou de la membrane plasmique (Chung *et al.*, 2000); kinésine (Reddy *et al.*, 1999).

La plupart de ces protéines cibles des CaMs activent des voies de transduction de signaux qui induisent un large spectre de réponses physiologiques (croissance, différenciation, division cellulaire, tolérance face à un stress, ...) (pour revue, Yang et Poovaiah, 2003).

- Structure, classification, expression

Les CaMs sont des petites protéines extrêmement bien conservées structurellement chez les eucaryotes (**Fig. 1.5**). Elles possèdent des sites liant le Ca²⁺, structures en hélice-boucle-hélice (Strynadka et James, 1989), appelées domaines « EF-Hand » (« Elongation

Factor-Hand »). Dans le groupe des CaMs dites « typiques », ces motifs « EF-Hand » sont au nombre de quatre et organisés par paires, en deux domaines globulaires distincts, stabilisant ainsi la protéine et augmentant son affinité envers le Ca²⁺. L'aptitude de la CaM à réguler l'activité de l'enzyme cible semble résider en des régions hydrophobes exposées lors du changement conformationnel, qui a lieu au moment de la fixation du Ca²⁺ sur la CaM.

	Motif « EF-Hand » I							TT		
		hélico	2	boucle	0 12	hélice			11	
HsCaM	MADQLTEEQIA	FKEAF	SLFDKE	GDGTI	TTKEI	GTVMRS	GQNPTEA	ELQDM	INEV DADG	60
DmCaM	MADQLTEEQIA	FKEAF	SLF <mark>DKD</mark>	GD <mark>G</mark> TI	TTKEI	GTVMRS	GQNPTEA	ELQDM	INEV DADG	60
AtCaM6	MADQLTDDQIS	FKEAF	SLF <mark>DKD</mark>	GD <mark>G</mark> CI	TTKEI	GTVMRS	GQNPTEA	ELQDM	INEV DADG	60
OsCaM1	MADQLTDEQIA	FKEAF	SLF <mark>DKE</mark>	GD <mark>G</mark> CI	TTKEI	GTVMRS	GQNPTEA	ELQDM	INEV DADG	60
ScCMD1	MSSNLTEEQIA	FKEAF	ALF <mark>DK</mark>	NNGSI	SSSEI	ATVMRS	GLSPSEA	EVNDL	MNEIDVDG	60
	*:.:**::**:*	*****	* : * * * * *	.:* *	***	· * * * * * * *	** .*:**	*::*:	·**:*.**	
HsCaM	NGTIDFPEFLIN	MARKN	KDTDSE	EEIRE	AFRVE	DKDGNG	YISAAELR	HVMTN	LGEKLTDE	120
DmCaM	NGTIDFPEFLTN		KDTDSE	E <mark>EIRE</mark>		DKDGNG	FISAAELR		LGEKLTDE	120
AtCaM6	NGTIDFPE FLNI	MARKN	KDTDSE	E <mark>ELKE</mark>		DKDQNG	FISAAELR		LGEKLSDE	120
OsCaMl	NGTIDFPE FLNI	MARKN	KDTDSE	E <mark>elke</mark>		DKDQNG	FISAAELR		LGEKLTDE	120
ScCMD1	NHQIEFSEFLAI	MSRQI	KSNDSE	Q <mark>ELLE</mark>	AFKVE	DKNGDG	LISAAELK	HVLTS	IGEKLTDA	120
* *:*.*** :*:*::****:*: ***:**: :* ***:**: :*										
		IV								
HsCaM	EVDEMIREADII	DGD <mark>G</mark> Q\	NYEEFV	'QMMTA	K 149)				
DmCaM	EVDEMIREADII	DGD <mark>G</mark> Q∖	NYEEFV	TMMT SI	K 149)				
AtCaM6	EVDEMIREADVI	DGD <mark>G</mark> QI	NYEEFV	KVMMA	K 149)				
OsCaM1	EVDEMIREADVI	DGD <mark>G</mark> Q1	NYEEFV	KVMMA	K 149)				
ScCMD1	EVDDMLREVS-I)GS <mark>G</mark> E]	NIQQFA	ALLSK	- 147	7				
	***:*:** *	**.*:	* ::*.	::						

Fig. 1.5: Les calmodulines (CaMs) sont des protéines très conservées chez les eucaryotes: alignement multiple de séquences de CaMs d'Homme (Hs, *Homo sapiens* (DDBJ/EMBL/ GenBank, numéro d'accès : M19311)), de drosophile (Dm, *Drosophila melanogaster* (NM 165870)), d'*Arabidopsis* (At, *Arabidopsis thaliana* (NM 180529)), de riz (Os, *Oryza sativa* (X65016)) et de levure (Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (M14760)) (réalisé grâce au programme Clustal W version 1.82 (Thompson *et al.*, 1994)). Les 4 motifs « EF-Hand » (I à IV) supposés sont mis en évidence en orange ; ils ont une structure en hélice-boucle-hélice ; les résidus en **rouge** représentent trois amino-acides les plus conservés de la boucle formée de 12 amino-acides (**D**, acide aspartique, en position 1 de la boucle ; **G**, glycine en position 6 ; **E**, acide glutamique en position 12). Les acides aminés en positions 1, 3, 5, 7, 9 et 12 de la boucle sont utilisés pour lier le Ca²⁺.

Les étoiles (*) réfèrent à des résidus identiques (55,7 %), les points doubles (:) à des substitutions conservées et les points (.) à des substitutions semi-conservées entre les différents résidus des séquences alignées.

La famille des CaMs végétales peut être divisée en deux groupes. Le premier comprend les « CaMs typiques » citées précédemment (par exemple, AtCaM1 à AtCaM7), qui sont hautement similaires entre elles et avec les CaMs animales et qui sont formées d'environ 147-149 aminoacides (**Fig. 1.6**). Le deuxième groupe est constitué de CaMs ayant des séquences peptidiques additionnelles et un nombre variable de motifs « EF-Hand » et sont appelées « CaM-related » (**Fig. 1.6**) ; la CaM53 de pétunia et la CaM61 de riz font partie de cette dernière classe.



Fig. 1.6 : Schématisation des motifs de certaines protéines calmodulines (CaMs) « typiques » et « CaM-related » chez les plantes (d'après Luan *et al.*, 2002) : les « CaMs typiques » (AtCaM2 et PhCaM81) contiennent quatre motifs « EF-Hand » (I, II, III et IV) (ovales orangés) alors que les protéines « CaM-related » présentent des domaines additionnels (indiqués par des rectangles) et peuvent avoir des motifs « EF-Hand » en plus ou en moins.

Chaque plante possède des familles de gènes, qui codent différentes isoformes de CaM. Ils sont exprimés de manière différentielle en réponse à un stimulus externe, dans des stades, des tissus ou des types cellulaires différentes. Les différentes isoformes se distinguent par leur aptitude à se lier à une protéine cible donnée ce qui leur confère des fonctions physiologiques distinctes.

- Localisation intracellulaire des CaMs végétales

Les CaMs sont exprimées dans le cytoplasme. Des CaMs ont été également trouvées dans le noyau (Van Der Luit *et al.*, 1999 ; pour revue, Gilchrist *et al.*, 1994), les peroxysomes (Yang et Poovaiah, 2002b), les chloroplastes (Jarrett *et al.*, 1982), la matrice extracellulaire (Sun *et al.*, 1995 ; Ma *et al.*, 1999) ou encore la membrane plasmique (Collinge et Trewavas, 1989 ; Fraichard *et al.*, 1996). Cette diversité de localisations cellulaires des CaMs pourrait s'expliquer par le fait que ces protéines doivent percevoir une signature calcique particulière et interagir avec des protéines cibles, appartenant à des compartiments distincts de la cellule (noyau, Szymanski *et al.*, 1996 ; réticulum endoplasmique, Hong *et al.*, 1999 ; chloroplastes, Yang et Poovaiah, 2000 ; matrice extracellulaire, Ma *et al.*, 1999 ; membrane plasmique,

Par exemple, AtCaM11 contient une insertion N-terminale de 22 glutamines ; PhCaM53 et OsCaM61 ont une extension C-terminale formée d'un domaine polybasique et d'un motif CaaL (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999 ; Xiao *et al.*, 1999, respectivement) ; AtCaM10 et AtCaM12 ont une extension C-terminale de fonction inconnue avec deux motifs « EF-Hand » additionnels pour AtCaM12 ; la protéine AtTCH3 (Sistrunk *et al.*, 1994) est formée de motifs « EF-Hand » additionnels et de séquences particulières ; TaCaM2-1 (Yang *et al.*, 1996) et Nt-rgsCaM (Anandalakshmi *et al.*, 2000) ne sont formées que de trois motifs « EF-Hand » et d'une séquence N-terminale non conservée.

⁽At, Arabidopsis thaliana; Ph, Petunia hybrida; Os, Oryza sativa; Ta, Triticum aestivum; Nt, Nicotiana tabacum)

Chung *et al.*, 2000 ; vacuole, Malmstrom *et al.*, 2000). Les mécanismes impliqués dans le ciblage des CaMs vers ces différents sites ne sont pas encore bien compris. L'isoprénylation pourrait constituer l'un d'entre eux. On peut citer l'exemple de la CaM53 de Pétunia. Lorsque cette protéine est géranylgéranylée, elle s'associe avec la membrane plasmique, et quand elle n'est pas géranylgéranylée, la protéine s'accumule dans le noyau (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Une autre CaM, la CaM61 de riz, présente une structure très similaire à celle de la CaM53 (**Fig. 1.7**).

Motif « EF-Hand » I	
MADQLTDDQIS <mark>EFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSL</mark> GQNPTEA <mark>ELQDMINEVDADG</mark>	60
MADQLTDDQIS <mark>EFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSL</mark> GQNPTEA <mark>ELQDMINEVDADG</mark>	60
MADQLTDEQIAEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG	60
MADQLSEEQIV EFREAFSLFDKDGDGSITTKELGTVMRSL GQNPTEA <mark>ELQDMISEVDADS</mark>	60
*****:::** **:*************************	
IIIII	
NGTIDFPEFLNLMARKMKDTDSEE <mark>ELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMTNL</mark> GEKLTDE .	120
NGTIDFPEFLNLMARKMKDTDSEE <mark>ELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMTNL</mark> GEKLTDE .	120
NGTIDFPEFLNLMARKMKDTDSEE <mark>ELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMTNL</mark> GEKLTDE .	120
NGNIEFKEFLGLMARKLRDKDSEEELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMANIGERLTDE	120
** . * : * * ** . ***** : : * . * * * *	
IV	
EVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKVMMAK	149
EVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKVMMANRRRRRIEESKRSVNSNISRSNNGRKVRKR	178
EVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKVMMAK 1	149
EVGEMISEADVDGDGQINYEEFVKCMMAKKRRKRIEEKREHDGGSRTKSAGPSAAPASKR	180
** *** ********************************	
-DRCTLL 184	
GÖKCATT T8.	
	Motif « EF-Hand » I MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG MADQLSEQIVEFREAFSLFDKDGDGSITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG MADQLSEQIVEFREAFSLFDKDGDGSITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMISEVDADS *****:::*****************************

Fig. 1.7: Comparaison de séquences de calmodulines (CaMs) de pétunia (Ph, *Petunia hybrida*) et de riz (Os, *Oryza sativa*) : l'alignement multiple réalisé grâce au programme Clustal W version 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) de séquences de deux CaMs de pétunia (PhCaM81 (DDBJ/EMBL/ GenBank, numéro d'accès : M80836) et PhCaM53 (M80831)) et de riz (OsCaM1 (X65016) et OsCaM61 (U37936)) met en évidence pour PhCaM53 et OsCaM61 une extension C-terminale particulière (en **rose et bleu**) de 35 et 38 amino-acides respectivement.

Chaque séquence de CaM est formée de quatre motifs « EF-Hand » (I, II, III et IV) permettant la liaison de la CaM avec le Ca^{2+} (en orangé) ; les résidus rouges représentent trois aminoacides conservés appartenant à la boucle de 12 résidus composant chaque motif « EF-Hand » (D, acide aspartique, en position 1 de la boucle ; G, glycine en position 6 ; E, acide glutamique en position 12). Les étoiles (*) réfèrent à des résidus identiques, les points doubles (:) à des substitutions conservées et les points (.) à des substitutions semi-conservées entre les différentes séquences alignées.

c. La calmoduline 61 de riz, OsCaM61

- Généralités

La CaM61 est une protéine de riz particulière (Xiao *et al.*, 1999). Elle possède une activité *in vitro* de fixation du Ca²⁺ (Dong *et al.*, 2002), qui est assurée par le domaine typique des CaMs, formé de 4 motifs « EF-Hand », situés dans les 149 aminoacides N-terminaux de la séquence. La particularité de cette protéine est due à la présence de 38 résidus supplémentaires en C-terminal. Un alignement des séquences de différentes CaMs de riz et de pétunia permet de mettre en évidence cette extension (**Fig. 1.7**). Cette particularité de structure n'a été mise en évidence, pour l'instant, que pour OsCaM61 et PhCaM53 (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Ces deux domaines C-terminaux présentent un pourcentage d'identité de 42 % (**Fig. 1.8**). La présence de ce domaine additionnel permet de classifier ces deux CaMs dans la famille des « CaM-related ».



Fig. 1.8: Alignement des extrémités C-terminales additionnelles des deux calmodulines (CaMs) de pétunia (PhCaM53) et de riz (OsCaM61) (réalisé grâce au programme Clustal W version 1.74 (Thompson *et al.*, 1994)) : elles sont formées par un domaine basique suivi d'un motif de type CaaL ; les résidus basiques sont figurés en **rose** (**R**, arginine ; **H**, histidine ; **K**, lysine), les aminoacides apolaires sont en **violet** (V,valine ; I, isoleucine ; A, alanine ; G, glycine ; P, proline), bleu (C, cystéine), et jaune (L, leucine).

Les étoiles (*) réfèrent à des résidus identiques (16 résidus), les points doubles (:) à des substitutions conservées et les points (.) à des substitutions semi-conservées entre les différentes séquences alignées (6+5=11 résidus). Selon cet alignement, les deux séquences ont 42 % de résidus identiques et 29 % d'aminoacides similaires.

- Analyse informatique de la séquence protéique de OsCaM61

Une analyse préliminaire de la séquence en aminoacides composant la protéine OsCaM61 a été entreprise à l'aide de différents programmes de bioinformatique. Le but de ce travail a été de découvrir certaines des propriétés de cette CaM (propriétés des aminoacides composant la protéine, profil d'hydrophobicité, présence de séquences transmembranaires) tout en recherchant des signaux spécifiques de localisation intracellulaire.

Analyse de la structure primaire de OsCaM61 :

Cette protéine de 187 résidus a une masse moléculaire apparente de 20,97 kDa (déterminée avec le programme ProtParam; Gasteiger *et al.*, 2005; <u>http://www.expasy.org/tools/protparam.html</u>). Une analyse des propriétés des acides aminés composant OsCaM61 montre que le domaine CaM N-terminal est formé d'une majorité de résidus neutres (65,1 %) et d'aminoacides chargés négativement (24,8 %) (**Fig. 1.9-a**). Cette




Fig. 1.9: La protéine OsCaM61 possède un domaine N-terminal à tendance acide, un domaine C-terminal basique suivi d'un motif CaaL ; OsCaM61 est formée de nombreuses régions hydrophiles

a. Représentation schématique des différents domaines composant la protéine CaM61: le domaine N-terminal, formé de 4 régions fixant le calcium est acide et suivi d'une région C-terminale basique ; sont représentés les pourcentages (%) en résidus acides (-), basiques (+) ou neutres (0).

b. Représentation graphique du profil d'hydrophobicité de OsCaM61 (selon Kyte et Doolittle): un pic « d'hydrophilicité » est observé au niveau de l'extension Cterminale de cette protéine (domaine basique et motif CaaL)

Ce profil a été réalisé à l'aide du programme ProtScale (<u>http://www.expasy.org/tools/protscale.html</u>; Gasteiger *et al.*, 2005) qui est basé sur la méthode d'analyse d'hydrophobicité établie par Kyte et Doolittle (1982).

c. Le domaine basique de OsCaM61 comporte deux régions hydrophiles (en bleu) alors que le motif CVIL a des propriétés plutôt hydrophobes (en rouge). Entre les deux extrêmes que sont les aminoacides en bleu ou rouge foncé, un gradient spécifique de nuances dans le bleu et le rouge est utilisé pour chaque résidu ; les aminoacides en noir forment une frontière entre deux régions. Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel SeqView (version 1.0.1); la distribution des charges positives (+) et négatives (-) dans la séquence C-terminale de OsCaM61 a aussi été schématisée ; les aminoacides non chargés sont représentés par le symbole «0».

partie de la protéine semble donc posséder des propriétés acides comme le sont de nombreuses CaMs. Par contre, l'extension C-terminale, est formée d'une majorité (34,2 %) de résidus chargés positivement, les acides aminés chargés négativement représentant 10,5 %. Cette séquence C-terminale, qui est enrichie en lysines et arginines et en aminoacides non

polaires (55,3 %), est appelée, par la suite, domaine basique (DB) (**Fig. 1.9-a**). Comme chez PhCaM53, le domaine basique de OsCaM61 est suivi du motif terminal CaaL. La présence de ce tétrapeptide suggère que la protéine OsCaM61 pourrait être le substrat d'une GGTase-I, comme cela a été démontré *in vitro* pour la protéine PhCaM53 (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Le tétrapeptide de OsCaM61, a pour séquence CVIL. La même séquence est présente chez la protéine humaine M-Ras, où elle est précédée d'une région polybasique d'environ 32 aminoacides (Matsumoto *et al.*, 1997) (**Fig. 1.10**). Rap2B, une autre protéine animale (Winegar *et al.*, 1991), possède aussi le motif CVIL mais pas de DB (**Fig. 1.10**). Il a été montré, que cette « Ras-related », sert de substrat pour une PTase (Farrell *et al.*, 1993). OsCaM61 est donc une protéine potentiellement géranylgéranylable, ce qui répond au premier critère nécessaire à la construction de notre outil de travail.



Fig. 1.10: Extrémités C-terminales de deux protéines humaines possédant, comme la protéine OsCaM61, une séquence d'isoprénylation de type CVIL: HsM-Ras (Hs, *Homo sapiens*; DDBJ/EMBL/ GenBank, numéro d'accès : AAM12632) possède un domaine basique composé de 34,2 % de résidus basiques (+) et 5,3 % d'aminoacides chargés négativement (-). Ce domaine est suivi du motif de type CVIL. Par contre, HsRap2B (Hs, *Homo sapiens*; DDBJ/EMBL/ GenBank, numéro d'accès : AAM12629) ne possède pas de domaine basique en C-terminal.

Les résidus basiques sont figurés en rose (R, arginine ; H, histidine ; K, lysine), les aminoacides apolaires sont en violet (V, valine ; I, isoleucine ; A, alanine ; G, glycine ; P, proline), bleu (C, cystéine) et jaune (L, leucine) ; les résidus acides sont en gris (D, acide aspartique ; E, acide glutamique).

Le profil d'hydrophobicité de OsCaM61, établi selon Kyte et Doolittle (1982) à l'aide du programme ProtScale, met en évidence de nombreuses régions hydrophiles (**Fig. 1.9-b**). Un pic majeur d'hydrophilicité se situe au niveau du domaine C-terminal basique, où sont

concentrés les résidus chargés positivement (lysines et arginines) (Fig. 1.9-b et c). Aucune région transmembranaire n'a été trouvée dans la séquence de OsCaM61 par le programme d'analyse informatique TMpred (Hofmann et Stoffel, 1993 http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED form.html). Cette CaM est donc, en théorie, une protéine soluble. L'ajout d'un groupement géranylgéranyle, sur la cystéine du motif CaaL aurait donc pour effet de modifier les propriétés physico-chimiques de OsCaM61, en rendant son extrémité C-terminale plus hydrophobe (Fig. 1.9-c). OsCaM61 serait donc capable, après avoir été isoprénylée, d'interagir avec des composants membranaires ou des protéines, processus qui serait renforcé par l'établissement d'interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement du domaine basique proximal et, par exemple, des phospholipides membranaires acides.

Prédiction « in silico » de la distribution intracellulaire de la protéine OsCaM61 :

Certains programmes informatiques permettent de prédire la distribution cellulaire de protéines d'intérêt. C'est le cas de PSORT (Nakai et Kanehisa, 1992 ; Nakai et Horton, 1999 ; http://www.psort.org/), qui détecte des signaux particuliers dans une séquence et permet de prédire la ou les localisation(s) intracellulaire(s) de la protéine. Il décrit la présence, chez OsCaM61, de deux séquences peptidiques caractéristiques. Il s'agit du motif consensus d'isoprénylation CaaX déjà identifié précédemment et d'un signal de localisation nucléaire (NLS, «Nuclear Localization Signal») situé dans le domaine basique de OsCaM61. Le programme conclu, avec une forte probabilité (score égal à 0,895), à une localisation potentielle de cette protéine de riz dans le noyau. Ce résultat est confirmé par un programme plus récent, dérivé de PSORTII, appelé WoLF PSORT (Horton et al., en publication; http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/). Ces deux programmes, PSORT et WoLF PSORT ainsi que le programme TargetP (Nielsen Emanuelsson al., 2000; et al., 1997 : et http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) ne prédisent pas d'autre localisation intracellulaire de cette protéine.

Une analyse de la séquence de OsCaM61 par le programme spécialisé dans la recherche des signaux de localisation nucléaire PredictNLS, a permis de confirmer la présence d'un motif NLS en position 148. Formé de cinq résidus, il aurait pour séquence « KKRRK » (**Fig. 1.11**). Le NLS est une courte région peptidique enrichie en aminoacides basiques qui



Fig. 1.11: Extrémité C-terminale de la protéine OsCaM61 et mise en évidence du motif NLS potentiel (en rouge) trouvé par le programme PredictNLS (Cokol *et al.*, 2000 ; <u>http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl</u>) ; ce motif est situé dans le domaine basique ; un signal de localisation nucléaire potentiel (de séquence RRRRR), pourrait aussi être présent dans la partie C-terminale de la protéine PhCaM53 mais n'est pas reconnu comme tel par le programme PredictNLS.

Les « + » représentent les charges positives des aminoacides basiques de l'extrémité C-terminale de OsCaM61

peut être positionnée dans différents endroits de la séquence protéique ; elle permet l'import de ces protéines dans le noyau grâce à un système particulier appelé NPC (« nuclear pore complex »), qui est un site situé dans l'enveloppe nucléaire (Feldherr *et al.*, 1984). La séquence de ce NLS potentiel est retrouvée dans celle de plusieurs autres protéines d'eucaryotes, qui sont toutes localisées dans le noyau (**Fig. 1.12**). Le motif NLS présent chez

Nom de la protéine (Numéro d'accès)	Organisme	Localisation intracellulaire	Fonction	Position de la séquence	Références
T2FA (P35269)	Homo sapiens	Noyau	Facteur d'initiation de la transcription	335- KKRRK	Dikstein et al., 1996
CY53 (P22697)	Neurospora crassa	Noyau	Impliquée dans l'expression de gènes structuraux	231- KKRRK	Fu et Marzluf, 1990 Kanaan et al., 1992
RPB1 (P14248)	Plasmodium falciparum	Noyau	Catalyse la transcription de l'ADN en ARN	1182- KKRRKRRRKNK région de liaison à l'ADN « DNA binding region »	Li et al., 1989
H2B1 (P02281)	Xenopus laevis	Noyau		27- KKRRK	Perry et al., 1985
SPT6 (P23615)	Saccharomyces cerevisiae	Noyau	Intervient dans l'initiation de la transcritption	77- KKRRK NLS	Swanson et al., 1990

Fig. 1.12: Les protéines possédant une séquence KKRRK ont toutes une localisation nucléaire (Numéros d'accès de la base de données UniProtKB/Swiss-Prot)

OsCaM61 pourrait donc constituer un signal de ciblage de la protéine dans le noyau. Pour la protéine RPB1 de *Plasmodium* (**Fig. 1.12**), le peptide KKRRK est situé dans une région de liaison à l'ADN (« DNA binding region »), favorisant l'interaction de la protéine avec l'ADN. Dans le cas de la protéine OsCaM61, la séquence NLS est aussi située dans une région chargée positivement (**Fig. 1.11**) et donc susceptible d'interagir avec l'ADN.

- Localisation *in vivo* de la protéine OsCaM61

Dong et coll. (2002) ont démontré que la protéine OsCaM61, fusionnée à la GFP et exprimée stablement dans des cellules de tabac BY-2, présente une localisation *in vivo* différente selon son état de prénylation. En effet, quand elle est fusionnée en N-terminal de la GFP (OsCaM61-GFP), la protéine chimère a une localisation cytoplasmique et nucléoplasmique. Lorsque le motif CaaL est rendu accessible, grâce à une fusion de la séquence de cette CaM avec l'extrémité C-terminale de la séquence de la GFP (GFP-OsCaM61), la protéine chimère s'accumule majoritairement dans les membranes (enveloppe nucléaire, réticulum endoplasmique, membrane plasmique). Dong et coll. (2002) ont montré que la localisation cellulaire de la protéine GFP-OsCaM61 dépendrait de son état de prénylation, grâce à des expériences réalisées avec la mévinoline, un inhibiteur de l'HMGR. En présence de l'inhibiteur, la fluorescence est présente dans le cytoplasme et le noyau. La localisation intracellulaire différente de OsCaM61 en fonction de son état de prénylation fait de cette protéine un outil de choix pour construire notre système expérimental.

1.3 Matériel biologique choisi, les cellules végétales TBY-2

a. Propriétés des cellules TBY-2

Le choix des cellules de tabac *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2 (TBY-2) a été dicté d'une part, par le fait que de nombreux aspects de leur biologie et leurs propriétés physiologiques sont connus (Nagata *et al.*, 1992). D'autre part, elles sont utilisées couramment au laboratoire pour de nombreuses études portant sur la biosynthèse et la fonction des isoprénoïdes ainsi que sur les enzymes impliquées (Hemmerlin et Bach, 2000 ; Hartmann *et al.*, 2000 ; Wentzinger *et al.*, 2002 ; Hemmerlin *et al.*, 2003 ; pour revue, Hemmerlin *et al.*, 2004). Ces suspensions cellulaires se caractérisent par un cycle cellulaire court (d'environ 14 heures, Nagata *et al.*, 1992), d'où une croissance très rapide. Leur courbe de croissance de forme sigmoïde se caractérise par trois phases typiques : une phase de latence (~2 jours), une phase exponentielle de croissance (~3 jours) et une phase stationnaire atteinte dès le 5^{ème} jour dans nos conditions (**Fig. 1.13**). Une prolifération si active fait de cette lignée un système expérimental adapté à des études métaboliques.





(a.) turbidimétrie: 1 ml de culture cellulaire est prélevé chaque jour pour en mesurer la densité optique à 600 nm (témoin d'absorption: 1 ml de milieu de culture MS supplémenté)

(b.) mesure du poids du culot: 1ml de cellules TBY-2 est prélevé et centrifugé à 12500 rpm pendant 5 min. et le culot est pesé (mg) journalièrement

(c.) «Packed Cell Volume » (P.C.V.): 1ml de culture cellulaire est centrifugé à 12500 rpm pendant 5 min. chaque jour ; le volume qu'occupe le culot résultant est estimé en µl (ul) de cellules

La durée de chaque phase (phase de latence: 2jours ; phase exponentielle: 3jours ; phase stationnaire atteinte dès le 5^{eme} jour) est estimée par rapport aux mesures réalisées en (**b**.) et (**c**.), la méthode de turbidimétrie étant moins précise que les autres pour des

fortes concentrations en cellules TBY-2

Les cellules BY-2 présentent une morphologie simple ; de forme souvent rectangulaire ou ovale, elles poussent en filaments, sous forme de monocouche, ce qui facilite leur observation. Les TBY-2 possèdent des plastes non photosynthétiques (Nagata *et al.*, 1992).

L'absence de chlorophylle est d'un grand intérêt, car cela permet de s'affranchir d'une émission dans le rouge, observée lorsque ce pigment est excité par une lumière bleue (à 488 nm, longueur d'onde utilisée pour l'excitation de la GFP). Dans les conditions d'observation de la GFP, les TBY-2 présentent une autofluorescence très faible, sous forme de structures ponctuées jaunes localisées autour du noyau (Fig. 1.14). Ces avantages ont ainsi été exploités

۵.



Fig. 1.14: Les cellules TBY-2 ont une autofluorescence jaune très faible, localisée autour du noyau, dans les conditions d'excitation et d'émission de la GFP. Cette autofluorescence de structures ponctuées, observées en microscopie confocale (objectif x63), apparaît en vert après numérisation de la cellule.

a. Cellule TBY-2 entière et vue nucléaire

b. Coupes réalisées dans le noyau cellulaire

(DIC, Contraste interférentiel différentiel de Nomarski; N, noyau; les points de repère sont en rose)

dans de nombreuses études de microscopie à fluorescence réalisées avec ce matériel. Les cellules TBY-2 sont, en effet, très souvent utilisées comme système d'expression et de localisation d'une protéine fluorescente (protéine chimère) couplé ou non avec l'utilisation d'une sonde (FM 4-64, MitoTracker) (en colocalisation avec une protéine chimère d'intérêt) (**Fig. 1.15**).



Fig. 1.15: Les TBY-2 (b.-e.) sont des cellules couramment utilisées dans des études microscopiques: leur paroi pectocellulosique très fine permet aux marqueurs fluorescents tels que le MitoTracker (b.) de pénétrer facilement dans la cellule contrairement à d'autres cellules (comme par exemple, les cellules de ronce (a.), lignée de Annie Hoeft) pour lesquelles le marqueur reste à la périphérie cellulaire. Le marqueur rouge FM4-64 (c.) met en évidence la membrane plasmique à la périphérie cellulaire. Les TBY-2 sont très souvent utilisées comme système d'expression et d'observation de l'accumulation intracellulaire de protéines fluorescentes comme la protéine verte fluorescente (GFP, d.) pouvant être utilisée en tant que protéine chimère, ou la protéine rouge fluorescente (RFP) dont la séquence a été, dans ce cas, flusionnée à celle d'un tripeptide (SKL) permettant le transit de la protéine chimère vers les peroxysomes (e.) (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; la barre blanche représente 10 µm ; les points de repère sont en bleu ; DIC, contraste interférentiel différentiel (Nomarski) ; M, mitochondrie ; MP, membrane plasmique ; Na, nucléoplasme ; Col, cytosol ; Pe, peroxysome ; N, noyau ; V, vacuole)

b. Mise en évidence de l'isoprénylation des protéines dans les cellules TBY-2

L'approche expérimentale choisie consiste à bloquer *in vivo* la production endogène de MVA et à fournir à la cellule un précurseur biosynthétique traçable. Dans notre cas, les cellules TBY-2 ont été traitées à la mévinoline (MV) (5 μ M) en présence de MVA ¹⁴C exogène et de squalestatine (SQ) (1 μ M). SQ est un inhibiteur spécifique de la squalène synthase, qui bloque la formation de squalène et la synthèse des composés en aval (stérols), une voie qui consomme la plus grande partie des molécules de FPP disponible (Hartmann *et al.*, 2000 ; Wentzinger *et al.*, 2002). Ce traitement permet donc de rediriger le flux du FPP radioactif biosynthétisé vers l'isoprénylation des protéines (**Fig. 1.16-a**). Les protéines





Fig. 1.16: Essais d'incorporation du radiomarquage issu du mévalonate dans les protéines extraites des cellules TBY-2 a. Principe de l'incorporation: les cellules traitées à la mévinoline et à la squalestatine sont mises en présence de mévalonate

radiomarqué (MVA^{*})

b. L'autoradiographie du gel révèle trois groupes de protéines radiomarquées

cellulaires sont extraites et mises à migrer sur gel SDS-PAGE. Après 6 semaines l'autoradiographie du gel met en évidence trois groupes de protéines radioactives, dont les masses moléculaires respectives ont été estimées à 32,5 kDa, 49,5 kDa et 60 kDa (**Fig. 1.16-b**), un résultat similaire à celui rapporté par Randall et coll. (1993). Il est intéressant de noter que des protéines isoprénylées de masses moléculaires voisines ont été décrites chez les mammifères.

Nos résultats indiquent donc clairement que les cellules TBY-2 sont capables de catalyser le transfert des molécules dérivées du MVA sur des protéines. Ils sont en accord avec le fait que des extraits acellulaires de tabac sont connus pour contenir une activité FTase (farnésyl transférase) mais aussi GGTase-I (géranylgéranyl transférase de type I) (Randall *et al.*, 1993 ; Biermann *et al.*, 1994). De plus, il a été montré que les cellules TBY-2, possèdent une activité de type farnésylcystéine α - carboxyl méthyl transférase et de type géranylgéranylcystéine α -carboxyl méthyl transférase, capable de méthyler des substrats prényl-cystéine synthétiques (Crowell *et al.*, 1998). Ces réactions, qui sont catalysées par une seule enzyme (Crowell *et al.*, 1998), sont essentielles pour l'association à la membrane des protéines isoprénylées et la fonction de certaines d'entre elles (voir introduction). Dans le cas de PhCaM53, protéine similaire à OsCaM61, il a été montré que l'isoprénylation et la carboxyl méthylation sont toutes deux nécessaires pour une association efficace de la protéine GFP-PhCaM53 à la membrane plasmique (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000b).

En résumé, les cellules TBY-2 constituent un système expérimental approprié pour l'étude de l'isoprénylation d'une protéine chimère d'intérêt. Comme nous venons de le voir, elles possèdent des activités prényl transférase et méthyl transférase endogènes, ainsi que des voies biosynthétiques fonctionnelles (Hemmerlin *et al.*, 2003) fournissant les précurseurs isopréniques (FPP et GGPP) nécessaires à la réaction d'isoprénylation. Le dernier partenaire de la réaction correspond à la protéine chimère OsCaM61 fusionnée à la GFP dont la construction sera décrite dans le chapitre suivant (**Fig. 1.17, page 63**).



Fig. 1.17: Trois partenaires (1, 2 et 3) interviennent dans la réaction d'isoprénylation: une **protéine** (1) qui va être modifiée grâce à une **enzyme** (2) par un substrat (3) de nature isoprénique. Afin de visualiser la localisation intracellulaire d'une protéine isoprénylée, nous voulons construire une protéine «rapporteur». Elle correspondra à la séquence de la GFP fusionnée à une séquence suffisante pour modifier la protéine chimère par un farnésyl diphosphate (FPP) ou un géranylgéranyl diphosphate (GGPP). (Vue en contraste interférentiel différentiel de Nomarski d'une cellule TBY-2 observée au microscope confocal (objectif x63) ; la barre d'échelle représente 10 μm)

2. Première étape : construction des protéines chimères isoprénylables à partir de OsCaM61

2.1 Choix de la partie peptidique C-terminale de OsCaM61 à fusionner à la GFP

OsCaM61 est formée de trois parties distinctes : un domaine CaM typique N-terminal, un domaine basique contenant un NLS potentiel ainsi qu'un motif CVIL. Doit-on fusionner génétiquement à la GFP l'ensemble de la séquence protéique de OsCaM61 ou seulement la partie C-terminale (domaine basique et motif CVIL)? Il s'agit de conserver la propriété particulière de la CaM61 de se localiser différentiellement *in vivo* en fonction de son statut de prénylation, en évitant, si possible, son activité de fixation de calcium assurée par le domaine N-terminal (Dong *et al.*, 2002). Pour notre travail, il serait préférable, en effet, que la localisation intracellulaire de la protéine GFP géranylgéranylable ne dépende que de la modification post-traductionnelle et des réactions post-isoprénylation associées en évitant d'éventuelles interférences de la protéine fonctionnelle avec les voies de signalisation calciques des TBY-2.

Pour les familles de GTPases animales Ras et Rho, il a été montré que les 10 à 20 aminoacides C-terminaux (région hypervariable), suffisent pour localiser les protéines de fusion avec la GFP correspondantes de manière identique à celle des protéines entières (Hancock *et al.*, 1990, 1991b ; Choy *et al.*, 1999 ; Michaelson *et al.*, 2001). Ceci est vrai, par exemple, pour les protéines H-Ras ou Rac1 (respectivement, Choy *et al.*, 1999 ; Michaelson *et al.*, 2001). Il en est de même pour la protéine végétale PhCaM53 : la partie C-terminale additionnelle (34 aminoacides) contient toute l'information nécessaire à sa localisation dans la membrane plasmique comme protéine entière (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Par contre, le motif CTIL à lui seul ne semble pas suffisant, puisqu'une GFP-CTIL montre une double localisation à la membrane plasmique et cytoplasmique (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Il est donc probable que le domaine peptidique additionnel de OsCaM61, proche de celui de PhCaM53, soit lui aussi suffisant et nécessaire pour une localisation intracellulaire correcte.

Des essais de prénylation *in vitro* indiquent que la CaM53 ou son extension Cterminale sont prénylées plus efficacement que le motif CTIL seul (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Il a été montré, en effet, qu'un domaine polybasique, situé à proximité du motif CaaL, induit une augmentation de l'efficacité (Vm) de la réaction (Caldelari *et al.*, 2001). Cette région chargée positivement augmente l'affinité (Km) de l'enzyme GGTase-I pour sa protéine substrat (Caldelari *et al.*, 2001). Chez les animaux, le domaine polylysine de K-Ras4B augmente l'affinité des CaaX prényl transférases (FTase mais aussi GGTase-I) pour cette protéine (James *et al.*, 1995). L'efficacité de prénylation par AtGGTase-I dépend non seulement de la présence d'un domaine polybasique, mais semble aussi dépendre de sa composition en charges ainsi que des résidus composant le motif CaaL (Caldelari *et al.*, 2001). La présence en position a2 du motif C-a1-a2-X d'un résidu polaire, diminue l'efficacité de prénylation, alors qu'elle est augmentée par la présence d'un résidu aliphatique (Caldelari *et al.*, 2001). Le motif C-a1-a2-L de OsCaM61, possède en position a2 un aminoacide aliphatique du type isoleucine qui pourrait donc augmenter l'efficacité de la réaction de géranylgéranylation.

En conclusion, pour toutes ces raisons, nous avons choisi de fusionner avec la GFP uniquement le domaine basique suivi du motif CVIL de OsCaM61 (Fig. 1.18-a, page 66).

2.2 Clonage de l'extrémité C-terminale de OsCaM61 et création d'une protéine de fusion GFP géranylgéranylable

La séquence codant pour les 38 résidus C-terminaux (domaine basique et motif CVIL) de OsCaM61 a été amplifiée par réaction de RT-PCR à partir d'ARNs isolés de jeunes plantules de riz (voir matériel et méthodes). La séquence amplifiée a été clonée dans le vecteur pGFP-MRC, en C-terminal de la GFP, pour donner pGFP-DBCaM-CVIL. Ce vecteur permet l'expression de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (**Fig. 1.18-b**). Cette nouvelle protéine a toutes les chances de servir de substrat à une GGTase-I. En effet, l'aminoacide C-terminal du tétrapeptide CaaX est une leucine. De plus, il a été montré qu'un extrait protéique de tabac, est capable de catalyser, en présence de GGPP tritié, la géranylgéranylation de Ras-CAIL, dont le tétrapeptide est similaire à CVIL ; en outre, Ras-CAIL est très peu farnésylée en présence de [H³]FPP (Randall *et al.*, 1993).



Fig. 1.18: Schéma représentant les différentes constructions réalisées dans le vecteur pGFP-MRC

a. Schématisation des quatre domaines « EF-Hand » (I,II, III et IV), du domaine basique et du motif CaaL de la protéine CaM61de riz (OsCaM61 (U37936))

b. Protéines de fusion GFP isoprénylables

c. Protéines de fusion GFP non isoprénylables (contrôles)

2.3 Création d'une protéine GFP farnésylable

Il est communément admis, selon les règles de spécificité de substrat établies chez les mammifères (Moores *et al.*, 1991), que la FTase catalyse la prénylation de substrats ayant un tétrapeptide CaaX où X correspond habituellement à une méthionine, sérine, alanine, glutamine. Afin de créér une protéine farnésylable, il suffit simplement de remplacer le résidu leucine terminal de la protéine GFP-DBCaM-CVIL par n'importe lequel de ces quatre résidus, ce qui peut être fait par mutation ponctuelle réalisée par PCR.

Des études de compétition ont montré que les motifs CaaX ayant la plus grande affinité pour une FTase animale de rat sont ceux qui comportent méthionine ou une sérine en position C-terminale (Reiss *et al.*, 1991). Dans le règne animal, de nombreuses protéines farnésylées, possèdent un motif terminé par une méthionine. Les protéines N-Ras, K-Ras4A et K-Ras4B possèdent elles aussi, un motif C-terminal du type CaaM (**Fig. 1.19-a**). Elles sont toutes trois modifiées *in vitro*, par une FTase, mais il a été décrit qu'elles peuvent aussi être substrats, *in vitro* d'une GGTase-I, avec toutefois une efficacité réactionnelle inférieure (Zhang *et al.*, 1997a). La protéine K-Ras4B, qui possède un motif CVIM (**Fig. 1.19-b**), est farnésylée *in vivo*, mais peut être aussi géranylgéranylée, lorsque la réaction de farnésylation est inhibée, par exemple, par l'inhibiteur B956 (Rowell *et al.*, 1997). En dépis de l'absence d'une spécificité stricte de substrat protéique, la protéine GFP-DBCaM-CVIM apparaît comme un bon substrat modèle farnésylable.



Fig. 1.19: Protéines animales ayant un résidu méthionine carboxy-terminal

a. Tableau regroupant des protéines humaines (Homo sapiens) possédant, en C-terminal, un motif de type CaaM ; sont précisés les numéros d'accès à la banque de données protéique NCBI

b. Séquence C-terminale de la protéine K-Ras4B humaine (Hs, *Homo sapiens*) : elle possède, comme la protéine GFP-DBCaM-CVIM que l'on souhaite construire, une séquence du type CVIM précédée d'un domaine de 24 acides aminés majoritairement basiques (62,5%). Les résidus chargés positivement sont figurés en **rose** (**R**, arginine ; **H**, histidine ; **K**, lysine), les aminoacides apolaires sont en **violet** (V,valine ; **I**, isoleucine ; **A**, alanine ; **G**, glycine ; **P**, proline ; **L**, leucine), bleu (C, cystéine) et jaune (M, méthionine).

¹ Protéines dont la farnésylation a été démontrée in vitro

² Protéines dont la farnésylation a été démontrée in vivo

Chez les plantes, seul un faible nombre de protéines possédant un motif CaaM ont été isolées jusqu'à présent (**Fig. 1.20, page 68**). Parmi elles figurent des protéines impliquées dans l'homéostasie des ions métalliques (Dykema *et al.*, 1999). On peut citer comme exemple, ATFP3, dont la farnésylation a été démontrée *in vitro* (**Fig. 1.20**). Par ailleurs, il a été montré qu'un extrait de tabac, catalyse la farnésylation de la protéine animale Ras-CAIM mais aussi

sa géranylgéranylation (Randall *et al.*, 1993). En outre, l'activité FTase de la tomate (LeFTase), est capable de farnésyler un peptide dérivé de K-Ras4B, ayant un motif CVIM identique à celui que l'on souhaiterait créer (Schmitt *et al.*, 1996).

Protéines farnésylables	Séquence CaaM	Description	Numéro d'accès
Protéine Rac-like (Bracha et al., 2002)	CLLM	GTPase	U88402
Protéine AIG-like	CIIM	Réponse à un pathogène (AIG, « Avirulence Induced Gene »)	NP_192732
ATFP3 ¹ (Dykema <i>et al.</i> , 1999)	CTVM	Protéine liant des métaux	AAD09507

Fig. 1.20: Protéines d'*Arabidopsis thaliana* ayant un résidu méthionine carboxy-terminal Sont précisés les numéros d'accès à la banque de données protéique NCBI

¹ ATFP3 est une protéine qui lie l'ion Cu^{2+} , l'ion Ni^{2+} et l'ion Zn^{2+} ; elle est farnésylée *in vitro* (Dykema *et al.*, 1999)

Pour toutes ces raisons, nous avons donc choisi de muter la leucine C-terminale de GFP-DBCaM-CVIL en méthionine. L'approche de mutagénèse dirigée par réaction de PCR a été choisie. Le produit a été sous-cloné en aval de la GFP dans le vecteur pGFP-MRC pour donner la protéine GFP-DBCaM-CVIM (**Fig.** MM.17 et Fig. 1.18-b). Il sera utilisé pour les expériences d'expression transitoire de la protéine de fusion GFP farnésylable dans un matériel végétal donné.

2.4 Création de protéines GFP contrôles non isoprénylables

Pour interpréter les résultats, il nous a paru nécessaire de créer des protéines non isoprénylables servant de contrôles. Pour cela, deux protéines chimères doivent être construites, l'une non farnésylable et l'autre non géranylgéranylable. L'approche choisie a consisté à remplacer par une sérine, la cystéine composant le motif CaaX, qui rappelons le est indispensable à la réaction d'isoprénylation. Par exemple, dans le cas de la protéine animale oncogène H-Ras, il a été montré que cette modification empêche la prénylation de la protéine (Lowy et Willumsen, 1993). Pour les protéines végétales, le remplacement de la cystéine par la sérine inhibe également la farnésylation *in vitro* de la protéine ANJ1 ou la géranylgéranylation *in vitro* de PhCaM53 (Zhu *et al.*, 1993 ; Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999).

Dans cette optique, nous avons créé les deux protéines modèles GFP-DBCaM-SVIL, non géranylgéranylable, et GFP-DBCaM-SVIM, non farnésylable, par mutagénèse dirigée. Comme précédemment, les séquences nucléotidiques correspondantes ont été placées sous le contrôle du double promoteur 35S dans le vecteur pGFP-MRC (**Fig. MM.17** et **Fig. 1.18-c**).

2.5 Construction d'une protéine GFP modifiable par une Rab-GGTase

Afin de compléter notre travail, une troisième protéine, substrat potentiel d'une Rab géranylgéranyl transférase, a été construite. Dans ce cas, il s'agit d'introduire un motif consensus du type XXCC, CCXX ou XCXC (C, cystéine; X, aminoacide indifférent) (Yalovsky *et al.*, 1996) à la place du motif CaaX. La question qui se pose est donc relative au choix qui doit être réalisé quant à la séquence amino-terminale de la protéine GFP doublement géranylgéranylable que l'on souhaite créér.

Il a été montré que les cellules TBY-2 possèdent une activité Rab-GGTase (Loraine *et al.*, 1996). En particulier, cette activité est capable de catalyser *in vitro* la double géranylgéranylation de trois protéines Rab de tomate (*Lycopersicon esculentum*), LeRab1A, LeRab1B et LeRab1C. LeRab1A et LeRab1C possèdent un motif terminal CCSS et LeRab1B, un motif particulier CCG. La réaction de double géranylgéranylation est plus efficace pour la protéine LeRab1B (Loraine *et al.*, 1996). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de construire la protéine chimère GFP-DBCaM-CCG. La séquence nucléotide correspondante a été obtenue par réaction de PCR et introduite dans le même vecteur que précédemment, pGFP-MRC (**Fig. 1.18-b**).

2.6 Analyse bioinformatique des séquences des protéines GFP, GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-CCG, GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM

Le remplacement du domaine CaM de OsCaM61 par une « étiquette » visualisable, en l'occurrence la GFP, entraîne une augmentation du poids moléculaire apparent qui passe de 21 à 32 kDa pour l'ensemble des cinq protéines chimères GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-CCG, GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM. Cette nouvelle

extrémité N-terminale est hydrophile, comme le peptide qu'elle remplace. Ces différentes protéines de fusion présentent donc un profil globalement hydrophile (**Fig. 1.21**), comme



Fig. 1.21: Figure regroupant les résultats de l'analyse bioinformatique des propriétés physico-chimiques ainsi que les prédictions des localisations intracellulaires des protéines suivantes: GFP, GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-CCG, GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM

(GFP, séquence de la protéine verte fluorescente ; DBCaM, domaine basique de la protéine OsCaM61 ; CaaX, motif d'isoprénylation ; CCX, motif de double géranylgéranylation ; SaaX, motif non isoprénylable)

ProtParam: http://www.expasy.org/tools/protparam.html; SOSUI: http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html; ProtScale: http://www.expasy.org/tools/protscale.html; TMpred: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; PredictNLS: http://cubic.bioc.columbia.edu/egi/var/nair/resonline.pl; NetNES: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/; PSORT: http://www.psort.org/; WoLFPSORT: http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/

celui de la protéine OsCaM61 (**Fig. 1.9, page 53**). Le programme TMpred n'a pas révélé de segment transmembranaire. La GFP, composée de 14,3 % de résidus chargés négativement et 10,5 % d'aminoacides positifs, est globalement neutre contrairement au domaine CaM acide qu'elle remplace. En résumé, les protéines chimères possèdent donc une extrémité N-terminale neutre suivie d'une séquence peptidique basique contenant un motif NLS et d'un tétrapeptide CaaX C-terminal d'intérêt (**Fig. 1.21**). Rappelons que la séquence de la GFP, n'apporte pas de motif de localisation cellulaire particulier.

Il nous a semblé intéressant d'analyser les séquences des protéines d'intérêt à l'aide des deux programmes de prédiction de localisation intracellulaire PSORT et WoLFPSORT. Ces programmes donnent des résultats divergeants (**Fig. 1.21**). Alors que PSORT, reconnaît à la fois la présence de motifs NLS et CaaX, WoLFPSORT, ne prend en considération que les motifs NLS. La divergeance de ces résultats pourrait s'expliquer par la présence simultanée dans la même séquence de deux signaux d'adressage (NLS et CaaX) à des sites cellulaires distincts pour les protéines GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CCG. On peut se demander alors lequel des deux motifs va être déterminant pour la localisation de la protéine. C'est ce défi que nous avons choisi de relever expérimentalement par l'expression transitoire *in vivo* des différentes protéines chimères et l'observation de leur localisation, qui ne sera conditionnée que par la divergence de leurs parties C-terminales (domaine basique et motif CaaX).

3. Expression transitoire des protéines de fusion GFP créées

3.1 Transformation par la technique de bombardement

Le concept de transfert d'acides nucléiques exogènes dans un matériel biologique par bombardement a été proposé en 1987 (Sanford *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987). Des particules, sur lesquelles a été précipité le matériel génétique à transférer, sont propulsées par un procédé balistique (accélération sous l'effet d'une force initiale) ce qui leur permet de passer la frontière paroi-membrane d'une cellule. Cette technique est utilisée pour transformer des bactéries (Shark *et al.*, 1991), des champignons (Armaleo *et al.*, 1990), des cellules animales (Williams *et al.*, 1991) ou végétales (Klein *et al.*, 1988a, 1988b ; Finer *et al.*, 1992 ; Brown *et al.*, 1994) ainsi que des organites intracellulaires tels que les chloroplastes (Ye *et al.*, 1990). Cette méthode de transformation offre un certain nombre d'avantages. Elle est peu coûteuse en temps. Elle permet l'introduction directe de l'ADN d'intérêt dans le matériel biologique choisi (organe, tissus, culture cellulaire) dont la préparation est rapide puisqu'elle ne nécessite pas d'étape de culture *in vitro*. Le procédé en lui-même est très simple cependant, un certain nombre de paramètres doivent être optimisés si l'on veut obtenir une efficacité de transformation élevée.

3.2 Optimisation de la technique dans le cas des cellules TBY-2

Pour obtenir la meilleure efficacité de transformation possible, il est nécessaire d'optimiser un certain nombre de paramètres physiques et biologiques.

a. Paramètres physiques

Les différents paramètres à prendre en considération concernent les particules utilisées, la pression du gaz entraîneur, le temps d'ouverture de l'électrovanne, la distance entre la seringue et le matériel biologique cible ainsi que le degré de vide effectué dans la chambre du canon (Heiser, 1995). Le dispositif disponible à l'I.B.M.P. est un appareil du type « Particle Inflow Gun » (PIG) (Finer *et al.*, 1992 ; Brown *et al.*, 1994) utilisant, comme force motrice, l'hélium. La taille, le type et la quantité des particules utilisées ainsi que leur méthode de préparation (voir Matériel et Méthodes 4.2-a) ont été choisis en fonction des expériences de transformation des cellules TBY-2 réalisées au préalable par Anne-Catherine Schmit (I.B.M.P., Strasbourg) (**Figure 1.22-a, page 73**). Ces paramètres ont été utilisés dans toutes les expériences que nous avons réalisées.

Pour chaque type de cible biologique, il est important de déterminer à la fois la pression du gaz entraîneur qu'il faut utiliser ainsi que la distance entre la seringue, dans laquelle sont placées les particules, et l'explant (**Fig. 1.22-b**). La pression d'hélium a été fixée

à 7 bars, une valeur qui assure une efficacité de transformation maximale dans le cas de cellules de maïs (Hunold *et al.*, 1994) et le temps d'ouverture de l'électrovanne à 25 ms. Quant à la longueur du trajet des particules, nous l'avons fait varier de 9 à 17 cm, avec un vide de la chambre du canon fixé à 0,8 bar (**Fig. 1.22-b**). Pour ces expériences, nous avons

-	
1	1.

Paramètres physiques constants	Choix réalisés
Type de particule	tungstène
Taille des particules	1,1 μm
Quantité particules / tir	500 µg
Quantité d'ADN plasmidique / tir	2 µg



Fig. 1.22: Le système « Particle Inflow Gun » (PIG) (Finer et al., 1992 ; Brown et al., 1994) et les paramètres physiques intervenant dans le bombardement

a. Paramètres physiques fixés pour les cellules de tabac BY-2

b. Schématisation du système PIG et représentation des paramètres physiques fixés (en bleu) et ceux qui ont été testés lors des expériences d'optimisation réalisées (en rouge)

(ms, millisecondes)

utilisé la construction pGFP-MRC, qui permet l'expression constitutive de la protéine GFP seule et nous avons compté, sous loupe binoculaire à fluorescence, le nombre de cellules émettant une fluorescence verte par boîte. L'efficacité optimale de transformation a été obtenue lorsque l'échantillon est placé à 11 cm de la seringue (**Fig. 1.23**). Si cette distance est réduite à 9 cm, le nombre de transformants passe de 268 à 131. Dans ces conditions, la vitesse des particules est augmentée, mais l'onde de choc, plus importante, serait davantage nocive pour les cellules.

Pression d'hélium (bars) Paramètre constant	Temps d'ouverture de l'électrovanne (ms) Paramètre constant	Vide partiel (bar) Paramètre variable	Position de l'échantillon par rapport à la seringue (cm) Paramètre variable	Moyenne du nombre de transformants par boîte
7	25	0,8	9	121
7	25	0,8	11	268
7	25	0,8	13	214
7	25	0,8	15	51
7	25	0,8	17	176
7	25	0,6	11	47
7	25	0,7	11	116
7	25	0,9	11	450

Fig. 1.23: Variation de deux paramètres lors d'une expérience de bombardement de cellules TBY-2: changement des conditions de vide (0,6 à 0,9 bar) et de la distance de tir par rapport à la seringue (9 à 17 cm). Pour chacune des conditions, deux boîtes ont été bombardées avec le vecteur pGFP-MRC. Les cellules positives, exprimant la GFP, ont été dénombrées par boîte sous la loupe binoculaire. Les résultats (colonne en violet) on été obtenus en faisant la moyenne des deux comptages réalisés pour chaque condition.

Un autre paramètre physique ayant un effet important sur l'efficacité de transformation est le vide qui est appliqué dans la chambre du canon au moment du bombardement. Il permet de réduire les frottements entre les particules et le gaz résiduel de la chambre. Les dommages occasionnés à l'ADN en sont réduits et l'intégrité des cellules préservée du fait d'une pénétration plus rapide des particules. Afin de d'évaluer l'effet de ce paramètre sur l'efficacité de transformation des TBY-2, les échantillons ont été placés à la distance optimale de 11 cm de la seringue et bombardés avec le vecteur pGFP-MRC dans différentes conditions de vide (valeurs testées comprises entre 0,6 bar et 0,9 bar) (**Fig. 1.23**). Plus le vide est grand, plus on observe de cellules TBY-2 qui fluorescent. Le nombre maximum d'évènements de

transformation (en moyenne 450 cellules positives par boîte) a été obtenu pour un vide de 0,9 bar. La figure **1.24** résume l'ensemble des conditions qui ont été utilisées par la suite.

Paramètres physiques	Valeurs optimales
Pression d'hélium	7 bars
Temps d'ouverture de l'électrovanne	25 ms
Vide partiel	0,9 bar
Distance seringue - cellules cibles	11 cm

Fig. 1.24: Paramètres physiques permettant d'obtenir une efficacité de transformation maximale

b. Paramètres biologiques

L'état physiologique dans lequel la cellule cible se trouve au moment de la transformation joue un rôle important sur la réceptivité face au transgène, son intégration et son expression. Des cellules jeunes, en phase exponentielle de croissance, semblent être le matériel idéal (De Block, 1993).

Les protocoles utilisés comportent généralement une étape de plasmolyse du matériel biologique (Vain *et al.*, 1993 ; Hunold *et al.*, 1994, 1995), qui résulte de l'ajout, dans le milieu de culture, d'agents osmotiques tels que le mannitol et le sorbitol. Cette étape de plasmolyse est considérée comme favorisant l'efficacité de transformation. Le détachement de la membrane plasmique de la paroi augmenterait la résistance de la cellule face à l'onde de choc, mais contribue à augmenter le stress subit par les cellules. De ce fait, nous nous sommes demandés s'il serait possible d'éviter cette étape. Nous avons réalisé deux essais de bombardement en parallèle, avec le vecteur pGFP-MRC, dans les conditions décrites précédemment, avec des cellules TBY-2, âgées de 3 jours, placées au préalable (5 heures avant le bombardement), sur un milieu solide contenant ou non du mannitol et du sorbitol. Après 16 à 20 heures de culture, le nombre de cellules transformées obtenu est sensiblement le même dans les deux situations. L'étape de plasmolyse ne semble donc pas essentielle dans le cas des cellules TBY-2 et nous avons donc décidé de ne pas la réaliser.

En conclusion, les expériences ultérieures de bombardement des TBY-2 ont été réalisées dans les conditions décrites précédemment, sans étape de plasmolyse. Les résultats d'une expérience type de bombardement, réalisée avec le vecteur pGFP-MRC, sont présentés dans la figure 1.25. Ils montrent que les transformants, en moyenne 450 ± 15 , ne sont pas répartis sur la boîte de façon homogène. La zone centrale de la boîte contient toujours environ 90 transformants. C'est dans cette partie de la boîte que seront prélevées les cellules positives, sélectionnées grâce à la loupe binoculaire à fluorescence, pour l'observation ultérieure au microscope à fluorescence.



Fig. 1.25: Répartition sur boîte du nombre de cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP observées sous la loupe binoculaire à fluorescence: deux tirs ont été réalisés par boîte pour deux essais de transformation lors d'une même expérience de bombardement. Les paramètres physiques utilisés lors de cette expérience sont: dépression égale à 0,9 bar, échantillon positionné à 11 cm de la seringue, temps d'ouverture de l'électrovanne 25 ms, pression d'hélium égale à 7 bars ; les cellules de tabac de 3 jours utilisés n'ont pas été plasmolysées.

3.3 Expression transitoire des protéines GFP isoprénylables

La figure MM.17 montre les différents vecteurs qui ont été utilisés dans les expériences de bombardement des cellules TBY-2. Après 16 à 20 heures, l'efficacité de transformation de chacun d'entre eux a été comparée avec celle obtenue avec le vecteur pGFP-MRC.

a. Localisation intracellulaire des protéines isoprénylables GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CCG dans les cellules TBY-2

- Observations sous la loupe binoculaire à fluorescence

Dans tous les cas, les cellules transformées émettent une fluorescence verte, ce qui démontre que les protéines GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CCG sont exprimées dans les cellules de tabac. Le nombre de transformants exprimant les protéines chimères (20-50 cellules) est toujours moins élevé que celui des cellules exprimant uniquement la GFP (450 cellules). Afin d'enrichir l'échantillon observé en vue d'une observation au microscope à fluorescence, les cellules positives sont prélevées une à une et placées entre lame et lamelle.

- Observations au microscope à fluorescence

Grâce à l'existence de filtres sélectionnés pour l'excitation et l'émission de la GFP, ce microscope constitue un outil d'observation plus performant, car il sélectionne la fluorescence émise uniquement entre 510 et 560 nm, c'est-à-dire au spectre de la lumière verte.

Les résultats obtenus indiquent que dans les cellules TBY-2 exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL la fluorescence est distribuée de façon majeure à la périphérie alors que le cytoplasme apparaît faiblement marqué. Les transformants exprimant la protéine farnésylable GFP-DBCaM-CVIM, possèdent en plus une fluorescence au niveau du noyau. Pour ceux exprimant la protéine géranylgéranylable GFP-DBcaM-CVIL, on distingue deux groupes de cellules. Dans le premier groupe, les cellules présentent uniquement une fluorescence périphérique tandis que dans le second, le noyau est également marqué.

- Observations au microscope confocal

Par rapport au microscope à épifluorescence classique, le microscope confocal permet d'observer un plan focal à travers la cellule. Nous avons sélectionné en particulier les coupes qui passent à travers le noyau et mettent en évidence le(s) nucléole(s). La figure 1.26 (page 78) montre la localisation cellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-

CVIM. Pour les deux protéines, la fluorescence apparaît sous forme d'une bande très fine, située à la périphérie des cellules, qui correspond probablement à la membrane plasmique. Ce « fil » de fluorescence verte, est bien plus net que dans les observations précédentes. Les résultats de localisation sont identiques à ceux obtenus avec le microscope à épifluorescence.



Fig. 1.26: Transformation par bombardement de cellules de tabac BY-2 exprimant transitoirement les protéines GFP-DBCaM-CVIL (**a**.) ou GFP-DBCaM-CVIM (**b**.) observées au microscope confocal (objectif x63). La barre blanche représente 10 μm

Dans certaines expériences, nous avons observé des cellules qui venaient de se diviser. Dans les cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, le noyau n'est jamais fluorescent. L'observation de telles images indique que les TBY-2 ont conservé leur capacité à se diviser, qui n'a donc pas été altérée par le processus de transformation et l'expression des protéines chimères.

Dans le cas des cellules de tabac exprimant la protéine doublement géranylgéranylable GFP-DBCaM-CCG, la fluorescence verte se localise exclusivement dans le noyau (**Fig. 1.27**). Comme dans les marquages nucléaires observés avec les protéines de fusion, farnésylable et géranylgéranylable, le(s) nucléole(s) est (sont) beaucoup plus fluorescent(s) que le nucléoplasme.



Fig. 1.27: Expression transitoire de la protéine doublement géranylgéranylable GFP-DBCaM-CCG: la protéine de fusion est exprimée grâce à deux promoteurs 35S constitutifs forts après bombardement des cellules de tabac BY-2 (Photo de microscopie confocale, objectif x63)

Il nous a semblé intéressant de déterminer si des observations similaires pouvaient être faites en utilisant d'autres matériels végétaux que les cellules TBY-2.

b. Localisation intracellulaire des protéines isoprénylables GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM dans des cellules épidermiques de poireau ou d'oignon Pour le bombardement des tissus de poireau et d'oignon, nous avons utilisé les mêmes paramètres que précédemment, exception faite du vide de la chambre de bombardement, qui a été fixé à 0,6 bar au lieu de 0,9 bar. Dans ces conditions, on observe une efficacité de transformation des cellules de poireau ou d'oignon identique par rapport aux cellules TBY-2. Ces deux tissus ont été choisis, car ils ne contiennent pas de chlorophylle et sont formés d'une seule couche de cellules, ce qui élimine les artéfacts liés à des couches de cellules superposées. Les cellules épidermiques de poireau, observées en lumière blanche, ont une forme très allongée parallélépipédique et les cellules épidermiques d'oignon, plus petites, ont des formes variées.

Les deux protéines farnésylable GFP-DBCaM-CVIM et géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL se localisent à la fois dans le noyau, le cytoplasme et à la périphérie cellulaire, dans les cellules de poireau ou d'oignon (**Fig. 1.28, page 81**). Contrairement aux observations réalisées chez le tabac, la protéine GFP-DBCaM-CVIL est toujours présente dans le noyau de ces cellules épidermiques.

Par contre, comme dans les cellules de tabac, la localisation des deux protéines isoprénylables à la périphérie cellulaire, qui correspond probablement à la membrane plasmique, est conservée dans les cellules de poireau et d'oignon. Les protéines isoprénylables GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM semblent donc être aussi modifiées post-traductionnellement dans ces deux matériels. Le domaine basique suivi de la séquence CaaX apparaît donc comme un motif universel pour l'isoprénylation des protéines dans divers organismes (tabac, oignon et poireau), mais aussi dans différents systèmes, cellulaire et tissulaire.

Notre étude sera poursuivie en utilisant comme matériel végétal les cellules TBY-2 du fait de leur manipulation facile et des avantages liés à ce type de cellules (voir ¶ 1.3-a).

a. Cellules de poireau

GFP-DBCaM-CVIL





b. Cellules d'oignon



Fig. 1.28: Cellules épidermiques de poireau ou d'oignon exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL ou GFP-DBCaM-CVIM
a. Cellules épidermiques de poireau
b. Cellules épidermiques d'oignon

La barre blanche représente 10 µm

c. Localisation intracellulaire des protéines non isoprénylables GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM

Les conditions de transformation des TBY-2 avec les constructions permettant l'expression des deux protéines non isoprénylables sont identiques à celles utilisées précédemment pour les protéines isoprénylables. La distribution intracellulaire des deux protéines GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM est identique. Elles se localisent dans le noyau (nucléoplasme et nucléole) des cellules TBY-2 (**Fig. 1.29**). Ces deux protéines





comportent un motif C-terminal d'isoprénylation dans lequel la cystéine a été mutée en sérine, qui n'est donc plus reconnu par la PTase, ce qui empêche leur isoprénylation. De ce fait, seul le deuxième motif de ciblage intracellulaire, à savoir le domaine basique comportant un motif NLS est conservé, ce qui explique leur accumulation dans le noyau. Cette localisation nucléaire de la fluorescence est donc typique de la localisation d'une protéine qui n'est pas modifiée post-traductionnellement.

Dans seulement quelques cas, nous avons observé, pour les deux protéines GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM, une fluorescence localisée à la périphérie cellulaire (membrane plasmique ?) en plus de la localisation nucléaire (**Fig. 1.29**). Etant donné que ces deux protéines ne sont pas modifiées par un résidu isoprénique hydrophobe et que la séquence N-terminale, qui correspond à la GFP, est globalement neutre, seul le domaine C-terminal chargé peut jouer un rôle dans la localisation à la membrane plasmique. Pour d'autres protéines, notamment dans le cas de K-Ras4B, il a été montré qu'un domaine riche en aminoacides basiques stabilise l'interaction avec la membrane. Les charges positives des résidus basiques peuvent, en effet, interagir avec les phospholipides anioniques membranaires. Nous pouvons donc imaginer que dans ces quelques cellules, les molécules de protéine non isoprénylable se localisent majoritairement dans le noyau et que la localisation à la membrane plasmique d'autres molécules soit due à une surexpression des protéines.

Afin d'éviter de tels artéfacts des expériences de transformation stable par bombardement des cellules TBY-2 ont été entreprises.

d. Transformation stable des TBY-2 par bombardement

Klein et coll. (1988b) ont montré qu'il est possible d'obtenir des lignées transformées stablement à partir de cellules de tabac par bombardement. Nous avons donc essayé de régénérer, à partir des cellules TBY-2 transformées par bombardement des transformants stables. Dans ce but, les transformants contenus dans les boites bombardées ont été sélectionnés sous loupe binoculaire à fluorescence. Nous avons choisi de les placer dans un « erlenmeyer » contenant du milieu MS liquide supplémenté et de les cultiver dans des conditions identiques à celles employées avec les cultures de TBY-2 sauvages (obscurité, 27° C, sous agitation constante de 154 RPM). Après quatre jours de culture, nous avons constaté

sous microscope à épifluorescence, la formation d'amas de cellules fluorescentes. La présence de ces microcals fluorescents verts montre que la construction introduite par bombardement et/ou la protéine exprimée se transmet de générations en générations sans que l'intensité du signal ne soit affectée.

Le fait que les cellules se présentent sous forme de microcals et non plus sous forme de filaments en monocouche pose un problème, car les cellules qui émettent une fluorescence verte sont superposées, ce qui rend l'observation difficile. Il a donc été nécessaire de choisir un autre protocole. Nous avons ainsi choisi d'agroinfecter les cellules de tabac avec un ADN-T contenant les séquences codant les protéines d'intérêt, dont l'expression peut être provoquée à un moment donné par un inducteur exogène. Avec un tel système, il est aussi possible de contrôler le niveau d'expression des protéines GFP, en réponse à une concentration donnée de l'inducteur.

3.4 Discussion des résultats

Nous avons montré que l'addition d'un domaine isoprénylable (domaine basique et motif CVIL ou CVIM) à une protéine GFP modifie sa localisation cellulaire, qui, de cytosolique et nucléoplasmique, devient majoritairement membranaire et/ou nucléaire.

Globalement, les protéines farnésylable (GFP-DBCaM-CVIM) et géranylgéranylable (GFP-DBCaM-CVIL) ont une distribution intracellulaire nucléaire et membranaire (MP). Dans certains cas, il a été possible d'observer une localisation exclusivement membranaire (MP) pour la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Il est intéressant de rappeler que les deux protéines isoprénylables possèdent dans leur séquence C-terminale, deux signaux de localisation intracellulaire reconnus (**Fig. 1.18, page 66**). Le premier signal est un NLS et le second, un motif d'isoprénylation CaaX.

La localisation à la membrane plasmique pourrait donc être due au motif CaaX et pourrait indiquer que les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM sont isoprénylées *in vivo*. De ce fait, il existerait donc une compatibilité entre le substrat protéique, c'est-à-dire la GFP suivie du domaine basique et du motif CaaX de la protéine CaM de riz, et les deux autres composantes de la réaction d'isoprénylation, à savoir, les PTases et le substrat

isoprénique présents dans les cellules de tabac. Ce système hétérologue semble donc bien fonctionnel. La localisation nucléaire d'une partie des molécules fluorescentes montre qu'elles ne sont pas isoprénylées, car cette localisation intracellulaire est typique des protéines non modifiées. Les molécules non isoprénylées seraient importées dans le noyau grâce à la présence du motif NLS. Ainsi, lorsque les protéines ne sont pas modifiées par un résidu isoprénique hydrophobe, ce serait le motif NLS qui dirige la protéine vers le noyau ; lorsqu'elles le sont, elles seraient ciblées à la membrane plasmique. L'interaction de la protéine avec la membrane plasmique serait stabilisée par le domaine polybasique. Dans le cas des cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, qui se localise exclusivement à la membrane plasmique, on peut supposer que toutes les molécules fluorescentes sont isoprénylées.

Dans le cas de la protéine GFP-DBCaM-CCG, nous observons une localisation exclusivement nucléaire, qui indique donc que cette protéine n'est pas isoprénylée. Le motif CCG ne serait pas suffisant pour être reconnu par une Rab-GGTase. Il a été montré par Yalovsky et coll. (1996) que la double géranylgéranylation des Rab-GTPases de tomate nécessite un motif conservé composé de deux cystéines. Le motif C-terminal d'isoprénylation (CCG) de la protéine GFP-DBCaM-CCG est présent également chez la protéine LeRab1B de tomate, qui est doublement géranylgéranylée (Yalovsky *et al.*, 1996). Comme chez les mammifères et les levures, la géranylgéranylation des protéines Rab végétales requiert la présence de séquences additionnelles localisées dans la région N-terminale de la protéine Rab pour une modification efficace des deux cystéines (Yalovsky *et al.*, 1996). L'absence de ces séquences en N-terminal de la protéine GFP-DBCaM-CCG pourrait donc expliquer l'absence de prénylation de cette protéine.

Le remplacement du motif CVIM ou CVIL par le motif XCCG, SVIL ou SVIM en Cterminal du domaine basique empêche donc la localisation à la membrane plasmique. Ce résultat démontre que les FTases et les GGTases-I reconnaissent bien un motif CaaX spécifique.

Dans le système de transformation par bombardement utilisé, les protéines sont exprimées sous la dépendance de deux promoteurs 35S. La présence de ces deux promoteurs forts, pourrait conduire à la surexpression des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, qui pourraient ne pas être toutes isoprénylées ce qui expliquerai l'obtention d'une fluorescence nucléaire. Cette absence de modification pourrait résulter de la présence d'une quantité limitante des PTases ou d'un manque de substrat isoprénique pour la réaction d'isoprénylation. Afin d'éviter de tels effets il serait préférable de pouvoir contrôler l'expression des protéines d'intérêt. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser un système de transformation stable des cellules TBY-2 par agroinfection.

4. Expression stable des protéines d'intérêt

4.1 Principes et avantages de la transformation stable des cellules avec le vecteur pTA7001

Nous avons choisi de transformer de façon stable les cellules de tabac BY-2 avec un vecteur particulier, qui permet une expression contrôlée des protéines d'intérêt au moment de l'ajout d'un inducteur dans le milieu de culture (pour revue, Gatz et Lenk, 1998). Aoyama et Chua (1997) ont construit un vecteur, le pTA7001, qui possède dans sa région ADN-T, un gène codant pour une protéine tripartite GVG (Fig. 1.30, page 87). Cette protéine est un facteur de transcription formé de trois parties : un domaine de fixation à l'ADN, un domaine d'activation de la transcription du gène étudié et un domaine récepteur d'une hormone glucocorticoïde, la dexaméthasone (DEX). La protéine GVG est synthétisée dans la cellule transgénique constitutivement et est présente dans le cytoplasme sous forme inactive. L'addition, dans le milieu de culture de la DEX, qui entre dans la cellule végétale (Aoyama et Chua, 1997 ; Lloyd et al., 1994) active la protéine GVG. Cette protéine se localise grâce à son motif NLS dans le noyau où elle interagira, par son domaine de fixation à l'ADN, avec le promoteur cible P6xUAS_{gal4} situé en amont de l'insert à exprimer. Le domaine activateur de la transcription de GVG stimule alors la synthèse de la protéine d'intérêt. Ce système présente l'avantage d'une réponse rapide, sensible, réversible et dépendante de la concentration en DEX ajoutée dans le milieu de culture (Aoyama et Chua, 1997).

Ainsi, nous avons choisi de cloner les séquences codant les protéines GFP, GFP-DBCaM-SVIM/L et GFP-DBCaM-CVIM/L dans le vecteur pTA7001.


Fig. 1.30: Principe du système d'induction de la synthèse protéique (par exemple, la protéine GFP) par la dexaméthasone dans une cellule transformée stablement par agroinfection

(NLS, signal de localisation nucléaire ; GFP, protéine verte fluorescente)

4.2 Clonage des différentes constructions dans le vecteur pTA7001 et obtention de transformants stables TBY-2

L'ensemble des séquences codant les protéines de fusion GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-SVIM, GFP-DBCaM-SVIL ainsi que celle de la GFP ont été amplifiées par PCR, avant d'être clonées entre les sites *Spe*I et *Xho*I du vecteur pTA7001. Les vecteurs créés (**Fig.** MM.18) ont été utilisés pour transformer les bactéries *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformation stable des cellules TBY-2 par la technique d'agroinfection consiste à mettre en coculture ces cellules végétales avec les bactéries pathogènes contenant les différents vecteurs pTAs. Après élimination des bactéries par lavages successifs, selon les protocoles traditionnels (Criqui *et al.*, 2000), les cellules sont étalées sur milieu MS gélosé supplémenté en antibiotiques (carbénicilline et hygromycine) et incubées dans les conditions de culture classiques. Cette étape permet de régénérer sur boîte des cals de cellules transformées après environ 3 semaines. Chaque amas de cellules a la particularité d'être issu d'une seule cellule agroinfectée et représente donc une lignée cellulaire. Ces cals sont ensuite chacun repiqués individuellement dans un milieu de culture liquide, afin de régénérer une culture en 3-4 semaines. Cette culture est repiquée hebdomadairement. Toutes les cultures n'expriment pas la protéine GFP d'intérêt (faux positifs).

Des modifications ont été apportées à ce protocole dans le but d'obtenir une culture en milieu liquide plus rapidement. Après lavage (élimination des agrobactéries), les cellules TBY-2 ont été placées directement dans un milieu de culture liquide. Après 3 à 4 semaines, les cellules sont en phase stationnaire. Elles sont alors repiquées tous les 7 jours de manière classique. Ce deuxième protocole, permet donc d'obtenir des transformants après 3 à 4 semaines au lieu de 6 à 7 semaines habituellement. Mais, dans ce cas, il faut noter que chaque culture cellulaire regroupe l'ensemble des lignées agroinfectées, exprimant ou non la protéine d'intérêt, contrairement aux cultures cellulaires obtenues par un protocole classique, qui permet de sélectionner une seule lignée cellulaire.

La figure 1.31 (page 89) montre que les lignées transformées avec le vecteur pTA-GFP-DBCaM-CVIL présentent une courbe de croissance sigmoïde comparable à celle des cellules TBY-2 sauvages, en présence ou en absence d'inducteur (DEX 10 µM). Ces résultats indiquent que l'addition de DEX 10 μ M n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules des quatre lignées cellulaires, comme c'est le cas pour d'autres matériels végétaux (Aoyama *et al.*, 1995 ; Böhner *et al.*, 1999 ; McNellis *et al.*, 1998). L'expression de la protéine géranylgéranylable n'interfère pas non plus avec la croissance des cellules.



Fig. 1.31: Courbes de croissance de cellules de tabac BY-2 sauvages ou transformées par agroinfection avec un vecteur pTA. Les cellules ont été mises en présence ou non de dexaméthasone 10 μM. Ces courbes ont été établies de trois manières: par turbidimétrie (**α**.), par mesure du poids du culot (**b**.) ou par la méthode «*Packed Cell Volume* » (P.C.V.) (**c**.). Les trois types de mesures ont été réalisées sur une même culture cellulaire repiquée le jour zéro dans les proportions habituelles (1:40).

Les TBY-2 présentent une courbe de croissance en trois phases (phase de latence, phase exponentielle de croissance et phase stationnaire) quelle que soit la manière dont elle a été établie en présence ou non de dexaméthasone. La durée de chaque phase (phase de latence: 2jours ; phase exponentielle: 3jours ; phase stationnaire atteinte dès le 5^{tmc} jour) est estimée par rapport aux mesures réalisées en (**b**.) et (**c**.), la méthode de turbidimétrie étant moins précise que les autres pour des fortes concentrations en cellules TBY-2

En absence de DEX, les lignées de transformants stables, n'expriment pas les différentes protéines GFP. En effet, aucune fluorescence verte n'est visible, lorsque les cellules transgéniques sont observées dans les conditions d'excitation et d'émission de la GFP.

Nous avons testé les effets de différentes concentrations en DEX (de 1 à 30 μ M) sur l'expression de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Le maximum de cellules exprimant la protéine fluorescente (18 %) est obtenu en utilisant 10 μ M de DEX pendant 15 heures (**Fig.** 1.32). Dans ces conditions, 82 % des cellules ne sont pas fluorescentes. Selon le protocole



Fig. 1.32: Effet de la concentration en dexaméthasone sur le nombre de cellules fluorescentes observées sur lame **a**. Conditions expérimentales: les lignées de transformants stables sont repiquées (proportion 1:4) puis mises en présence de différentes concentrations de dexaméthasone (1, 3, 10 ou 30 μ M). Au bout de 15 heures, une fraction cellulaire est observée sous microscope (DEX, dexaméthasone ; hpI, heures post-induction)

b. Histogramme représentant le pourcentage de cellules fluorescentes et non fluorescentes observées en fonction de la concentration en dexaméthasone utilisée: les cellules fluorescentes, exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, sont observées et dénombrées en lumière bleue et les cellules totales sont comptées sur lame en lumière blanche (objectif x20 du microscope confocal) (Cell fluo, cellules fluorescentes ; Cell non fluo, cellules non fluorescentes)

utilisé, ces lignées de transformant stables obtenues correspondent à l'ensemble des cellules de la population agroinfectée. Ainsi, dans les conditions d'induction de 15 heures, avec une concentration de 10 μ M de DEX, les 82 % des cellules qui n'expriment pas la protéine sont des cellules dans lesquelles le transgène est présent (car ces cellules sont résistantes à l'hygromycine), mais la protéine n'est pas exprimée (faux positifs). Nous avons choisi d'utiliser, par la suite, 10 μ M de DEX, laissée en contact avec les cellules pendant 15 heures.

4.3 Localisation intracellulaire des protéines GFP, GFP-DBCaM-SVIL/M et GFP-DBCaM-CVIL/M

La biosynthèse des protéines d'intérêt a été provoquée par l'ajout de DEX 10 μ M dans le milieu de culture des transformants stables fraîchement repiqués. L'observation sous microscope confocal est réalisée après 15 heures.

Dans ces conditions, la protéine GFP se localise dans le nucléoplasme et le cytosol cellulaire. Les deux protéines GFP-DBCaM-SVIL et GFP-DBCaM-SVIM se localisent exclusivement dans le noyau (nucléoplasme et nucléole). Du fait de la distribution intracellulaire identique de ces deux types de protéines non isoprénylables, les expériences ultérieures ont été réalisées avec une seule protéine appelée GFP-DBCaM-C/S (**Fig. 1.33**). La



Fig.1.33: Distribution de la protéine non isoprénylable GFP-DBCaM-C/S dans une cellule de tabac BY-2 (photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repères sont en rose ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; N, noyau)

protéine GFP-DBCaM-CVIM se localise dans le noyau des cellules TBY-2 (33 % de l'intensité de fluorescence) ainsi qu'à la périphérie de la cellule (49 % de l'intensité de fluorescence) qui représente probablement la membrane plasmique (**Fig. 1.34** et 1.36-b, page 94). La protéine GFP-DBCaM-CVIL se distribue majoritairement à la périphérie (membrane



Fig. 1.34: Localisation intracellulaire de la protéine farnésylable GFP-DBCaM-CVIM exprimée stablement dans une cellule TBY-2 (photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en rose ; DIC, contraste interférentiel différentiel (Nomarski) ; N, noyau)

plasmique) des cellules de tabac BY-2 (87 % de l'intensité de fluorescence) (**Fig. 1.35** et 1**.36a**, **page 94**). Ces observations sont similaires à celles qui ont été réalisées avec les cellu-







Fig. 1.35: Localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL

Les cellules TBY-2 transgéniques, en phase stationnaire de croissance, sont repiquées (proportion 1:4) et mises en présence de dexaméthasone 10 μ M afin d'induire l'expression de la protéine fluorescente géranylgéranylable. Après 15 heures, elles sont observées au microscope confocal (objectif x63)

(les points de repère sont en rose ; N, noyau ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)



Fig. 1.36: Distribution intracellulaire de la fluorescence des protéines GFP-DBCaM-CVIL (**a**.), GFP-DBCaM-CVIM (**b**.) et GFP-DBCaM-C/S (**c**.) dans les cellules TBY-2 après 15 heures d'induction à la dexaméthasone 10 μM

les exprimant de façon transitoire les protéines GFP, GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM. La seule exception concerne la protéine GFP-DBCaM-C/S. En effet, une localisation nucléaire exclusive de la fluorescence a été observée dans les transformants stables, alors qu'une localisation membranaire était aussi parfois présente dans les transformants transitoires. Cette fluorescence membranaire pourrait résulter d'une surexpression des protéines liée aux deux promoteurs forts employés.

Il est à noter que la distribution intracellulaire des protéines modifiables par un groupe géranylgéranyle (GFP-DBCaM-CVIL) ou par un groupe farnésyle (GFP-DBCaM-CVIM) et celle de la protéine non isoprénylable (GFP-DBCaM-C/S) est bien distincte de celle du dérivé de farnésol fluorescent qui se localise dans les structures membranaires des cellules TBY-2 (**Fig. 1.37**).





Fig. 1.37 : Localisation intracellulaire du farnésol fluorescent: les cellules TBY-2 sauvages sont mises en présence de farnésol fluorescent pendant 12 heures ; les photos de microscopie confocale (objectif x63) représentent une coupe réalisée au niveau du noyau de la cellule de tabac ainsi qu'une coupe réalisée au niveau du cytoplasme cortical. (N, noyau ; V, vacuole ; Ca, cytoplasme ; MN, membrane nucléaire ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; les points de repère sont en rose)

Les cellules exprimant les deux protéines d'intérêt, la protéine farnésylable et la protéine géranylgéranylable, sont dans un état physiologique satisfaisant, ce qui est montré par la fluorescence rouge des mitochondries en présence du marqueur MitoTracker[®] (**Fig. 1.38** et **1.39, page 97**). On peut observer exceptionnellement une colocalisation de vésicules



Fig. 1.38: Expression de la protéine GFP-DBCaM-CVIL et marquage de la cellule au MitoTracker

Les lignées transformées stablement avec la séquence codant pour la protéine GFP-DBCaM-CVIL sont fraîchement repiquées (proportion 1:4) et mises en présence de dexaméthasone 10 µM pendant 15 heures avant d'être observées en microscopie confocale. Le MitoTracker est introduit dans le milieu de culture juste avant l'observation (objectif x63).

a. Vue d'une cellule entière

b. Vue nucléaire représentant deux cellules soeurs en début de phase G1 avec une membrane plasmique nouvellement formée (MP, flèches **vertes**) séparant les deux noyaux sœurs encore proches l'un de l'autre ; ces images mettent en évidence un marquage rouge qui colocalise partiellement avec les vésicules fluorescentes vertes localisées dans le cytosol périnucléaire

(DIC, contraste interférentiel différentiel (Nomarski); M, mitochondrie; N, noyau; MP, membrane plasmique; les points de repère sont en jaune; les flèches **rouges** indiquent les mitochondries; les flèches jaunes indiquent une colocalisation de la fluorescence verte et rouge)

vertes cytoplasmiques avec la fluorescence rouge du MitoTracker[®]. Cette colocalisation des deux fluorescences verte et rouge, suggère que les deux protéines isoprénylables (GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM) pourraient s'associer partiellement aux mitochondries.



b.



Fig. 1.39: Cellules de tabac exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIM en présence de MitoTracker

Les cellules arrivées en phase stationnaire de croissance sont repiquées dans les proportions 1:4 et mises en présence de dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures avant d'être traitées avec le marqueur MitoTracker et observées sous microscope confocal (objectif x63).

a. Cellule exprimant la protéine fluorescente GFP-DBCaM-CVIM et marquage des mitochondries

b. Vue nucléaire mettant en évidence le marquage de composants cytoplasmiques par la protéine GFP-DBCaM-CVIM et les mitochondries situés dans le cytosol périnucléaire: une colocalisation partielle du marqueur rouge et de la fluorescence verte est observée (flèches rouge et jaune)

(M, mitochondrie ; DIC, contraste interférentiel différentiel (Nomarski) ; les points de repère sont en jaune ; les flèches **rouges** indiquent des mitochondries ; les flèches jaunes indiquent une colocalisation de la fluorescence rouge et verte)

Afin de compléter notre étude portant sur la localisation intracellulaire des protéines isoprénylables, nous avons choisi de suivre l'évolution du marquage en fonction de la durée d'induction.

4.4 Cinétique d'expression in vivo des protéines de fusion GFP isoprénylables

Pour cette expérience, l'induction de la biosynthèse des protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CVIL est réalisée par 10 µM de DEX. L'ajout de cette hormone stéroïde dans le milieu de culture des quatre lignées de transformants stables, fraîchement repiquées, correspond au temps zéro de l'expérience. La localisation intracellulaire des différentes protéines fluorescente est alors observée au cours du temps.

Aucune fluorescence verte n'est observable après 1 à 2 heures. Seules des structures ponctuées, qui fluorescent faiblement dans le jaune, localisées autour du noyau sont observables. Pour les quatre lignées la fluorescence verte apparaît après 2 à 3 heures. A ce stade, la protéine GFP a une localisation cytosolique et nucléoplasmique et la protéine GFP-DBCaM-C/S, une localisation nucléaire. Les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM se localisent dans le noyau et la membrane plasmique. Alors que la distribution intracellulaire des protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S et GFP-DBCaM-CVIM ne change pas au cours du temps, il n'en est pas de même pour la protéine GFP-DBCaM-CVIL (Fig. 1.40, page 99). En effet, deux groupes de cellules exprimant cette protéine sont observables : un premier groupe, dans lequel la protéine a une localisation membranaire et nucléaire (MP et N), et un second, dans lequel elle a une localisation exclusivement membranaire (MP). Le nombre de cellules composant chacun des deux groupes évolue au cours du temps. Le groupe de cellules MP+N est plus important après 6 heures (82 % des cellules) qu'après 15 heures (0 %) (Fig. 1.41, page 100). A ce stade, aucune cellule ne présente de fluorescence nucléaire, ce qui suggère que toutes les molécules de GFP-DBCaM-CVIL sont isoprénylées. La présence de molécules fluorescentes dans le noyau dans les premières heures après l'induction pourrait résulter ou bien d'un manque de substrat isoprénique ou bien d'une quantité limitante en GGTase-I. Afin de tester la première possibilité, l'induction de la synthèse de la protéine



Fig. 1.40: Etude de la distribution intracellulaire des protéines GFP (**a**.), GFP-DBCaM-C/S (**b**.), GFP-DBCaM-CVIM (**c**.) et GFP-DBCaM-CVIL (**d**.) au cours du temps: la synthèse des protéines est induite à la dexaméthasone (DEX) 10 μ M et la localisation intracellulaire est observée au microscope confocal (objectif x63) à un temps donné (hpI, heures post-induction). La barre blanche représente 10 μ m



Fig. 1.41: Observation de la distribution intracellulaire de la fluorescence verte émise par la protéine GFP-DBCaM-CVIL au bout de 6 et 15 heures de présence de la dexaméthasone 1, 3, 10 ou 30 μ M

a. Conditions expérimentales: les lignées transgéniques sont repiquées et mises en présence de différentes concentrations de dexaméthasone (1, 3, 10 ou 30 μ M) pour une durée de 6 et 15 heures (DEX, dexaméthasone ; hpI, heures post-induction)

b.-c. Histogrammes représentant le pourcentage de cellules ayant une localisation membranaire de la fluorescence (MP, membrane plasmique) ou une distribution membranaire et nucléaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (MP+N)

GFP-DBCaM-CVIL a été réalisée en présence de 20 μ M de géranylgéraniol (GGol), la forme alcool du GGPP, subtrat de la géranylgéranylation (voir Chapitre II, partie 2). La figure 1.42 montre une disparition complète de la fluorescence nucléaire après 9 heures d'induction.





a. Conditions expérimentales

b. Localisation intracellulaire de GFP-DBCaM-CVIL en fonction de l'apport de GGol 20 µM

MP: pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine fluorescente se localise à la membrane plasmique MP+N: pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL se localise dans la membrane plasmique et le

noyau

Dans ces conditions toutes les molécules de GFP-DBCaM-CVIL sont isoprénylées et localisées dans la membrane plasmique, ce qui indique que les molécules de GGol ont été métabolisées en GGPP nécessaire à la géranylgéranylation de la protéine. La présence d'une fluorescence nucléaire dans les premiers stades de l'induction résulte donc d'un manque en substrat isoprénique. Après 15 heures, le substrat isoprénique n'est plus limitant c'est donc la durée d'induction qui sera choisie pour les expériences ultérieures.

5. Localisation à la membrane plasmique des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM

Comme nous venons de le voir, les cellules TBY-2 exprimant les deux protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM présentent une fluorescence verte à la périphérie, qui pourrait être associée à la membrane plasmique. Dans le but de vérifier cette localisation, deux approches ont été employées : d'une part l'utilisation d'un détergent, le triton X-100, d'autre part, un marquage avec une sonde fluorescente, le FM4-64.

5.1 Traitement des cellules transgéniques avec un détergent

Nous avons choisi d'utiliser un détergent afin de déterminer si les deux protéine GFP-DBCAM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM sont véritablement associées à la membrane plasmique. En effet, un détergent comme le triton X-100 permet de déstabiliser les interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique et de ce fait, de tester le degré d'affinité des protéines prénylées pour les composants membranaires.

Après 15 heures d'induction en présence de DEX 10 μ M, les cellules TBY-2 exprimant les protéines isoprénylables, GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, la protéine GFP-DBCaM-C/S et la protéine GFP libre ont été traitées avec 0,05 % de triton X-100 pendant 10 minutes avant d'être observées au microscope confocal (Schmitt, 2002).

Dans ces conditions, les TBY-2 exprimant la GFP ne sont plus fluorescentes. Le même résultat a été obtenu pour les exprimant la protéine GFP-DBCaM-C/S. Cette perte de fluorescence à la fois cytosolique et nucléaire, induite par le triton X-100, résulterait de la désorganisation des membranes (membrane plasmique et membrane nucléaire), entraînant une « fuite » des molécules de protéine fluorescentes. La protéine GFP-DBCaM-C/S n'est pas retenue dans le noyau, ce qui signifie qu'elle n'est pas engagée dans des interactions fortes protéine-acide nucléique ou protéine-protéine. Avec le même matériel, un traitement au triton réalisé dans les mêmes conditions conduit à la « solubilisation » des cyclines A1 ; 1 et A3 ; 1, alors qu'il n'affecte pas la localisation nucléaire de la cycline A3 ; 2.

Par contre, les cellules exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM conservent la fluorescence verte présente à la périphérie en présence de triton. Cependant, comme le montre la figure 1.43, le contour de la cellule n'est plus bien délimité et

Cellules non traitées

Triton X-100



GFP-DBCaM-CVIL

Fig. 1.43: Effet du traitement au triton X-100 des cellules TBY-2 exprimant soit la protéine GFP farnésylable (GFP-DBCaM-CVIM) soit la protéine GFP géranylgéranylable (GFP-DBCaM-CVIL): les cellules transgéniques sont repiquées (dans les proportions 1:4) et mises en présence de dexaméthasone 10 µM. Après 15 heures de culture dans les conditions standard, elles sont traitées avec 0,05% de triton X-100, 10 min avant d'être observées sous microscope. (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; la barre d'échelle correspond à 10 µm ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

sa fluorescence devient diffuse. La persistance d'une fluorescence à la périphérie des cellules suggère fortement que les deux protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM sont associées avec la membrane plasmique et que cette interaction est capable de résister au triton 0,05 %.

Afin de confirmer la localisation à la membrane plasmique des deux protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, nous avons réalisé des essais de colocalisation avec un marqueur de la membrane plasmique, le FM4-64.

5.2 Le marqueur FM4-64

Le FM4-64 est un marqueur fluorescent rouge. La structure de cette molécule amphiphile, est présentée dans la figure 1.44. Elle est caractérisée par trois parties dont une queue hydrophobe qui lui permet d'interagir avec les membranes. Le FM4-64 présente la particularité d'être fluorescent dans un environnement hydrophobe.



Fig. 1.44: Structure du FM4-64

Le FM4-64, est une molécule amphiphile qui est formée de trois composantes : la queue hydrophobe qui permet la partition dans les membranes, la tête dicationique et le corps qui contient des noyaux aromatiques et doubles liaisons qui déterminent les propriétés spectrales du marqueur (d'après Betz *et al.*, 1996).

Le FM4-64 est décrit dans la littérature comme un marqueur de la membrane plasmique. Il a été utilisé pour l'étude du trafic membranaire, en particulier les phénomènes d'endocytose et d'exocytose dans les cellules animales (Heuser *et al.*, 1993 ; Betz *et al.*, 1996), les champignons (Vida et Emr, 1995 ; Fischer-Parton *et al.*, 2000 ; Hoffmann et Mendgen, 1998) et les plantes (Belanger et Quatrano, 2000 ; Bolte *et al.*, 2004b).

Les cellules de tabac BY-2 sauvages ont été mises en présence de FM4-64 ($6.7 \mu g/ml$) puis observées en microscopie confocale après différentes périodes de temps comprises entre 5 minutes et 2 heures (**Fig. 1.45** et 1.45bis, page 106). Après 5 minutes, la fluorescence rouge



Fig. 1.45: Distribution intracellulaire du FM4-64 au cours du temps
Le marqueur se localise à la membrane plasmique des cellules TBY-2 après 5 minutes de contact (a.), puis dans des structures ponctuées cytosoliques (b. et c.) (Observations réalisées avec l'objectif x63 du microscope confocal) (la barre blanche représente 10 µm ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

est associée exclusivement à la membrane plasmique. Après 10 minutes, elle apparaît aussi dans des structures ponctuées situées dans les travées cytoplasmiques. Ces structures deviennent plus nombreuses au cours du temps et se localisent essentiellement dans la région périnucléaire. Elles pourraient résulter d'un phénomène d'endocytose (Belanger et Quatrano, 2000). Lorsque les cellules TBY-2 marquées au FM4-64 durant 5 minutes sont mises en présence de mannitol 0,23 M, on observe que la fluorescence rouge reste localisée à la membrane plasmique qui dans ces conditions de plasmolyse se décolle de la paroi cellulaire (**Fig. 1.46, page 106**).



Fig.1.45bis: Vue cytoplasmique d'une cellule TBY-2 traitée 2 heures au FM4-64 (6.7 µg/ml) et observée au microscope confocal (objectif x63) (la barre blanche représente 10 µm; DIC, Contraste

interférentiel différentiel de Nomarski)



Fig.1.46: Plasmolyse des cellules TBY-2 marquées au FM4-64: les cellules sont mises en contact du marqueur rouge FM4-64 (6.7 μ g/ml) et de mannitol (0,23 M) et sont observées au microscope confocal (objectif x63) au bout de 10 minutes (la barre blanche représente 10 μ m ; DIC, Contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

5.3 Expérience de colocalisation des protéines GFP isoprénylables avec le FM4-64

Afin de confirmer que le marquage vert des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVII situé à la périphérie cellulaire est bien associé à la membrane plasmique, les cellules traitées par la DEX 10 μM pendant 15 heures, ont été mises en présence de FM4-64 (6.7 μg/ml) et observées après 5 minutes au microscope confocal. Pour les deux protéines GFP isoprénylables, le marquage vert périphérique colocalise avec le marquage rouge du FM4-64 comme le montre la fluorescence jaune observée (**Fig. 1.47, page 107**). Dans le cas des protéines GFP et GFP-DBCaM-C/S les deux signaux rouge et vert présentent une localisation distincte (**Fig. 1.48, page 108**). Les mêmes cellules ont été mises en présence de mannitol 0,23 M. Dans le cas des cellules qui expriment la protéine GFP-DBCaM-CVIL et la protéine GFP-DBCaM-CVIM la fluorescence jaune résultant de la colocalisation des deux marqueurs rouge (FM4-64) et vert est conservée, ce qui démontre clairement que les deux protéines isoprénylées sont associées à la membrane plasmique. Dans le cas des cellules exprimant la GFP et la GFP-DBCaM-C/S aucune fluorescence jaune n'est observée (**Fig. 1.49, page 109**).





Fig. 1.47 : Essais de colocalisation à la membrane plasmique du marqueur rouge FM4-64 avec la protéine GFP-DBCaM-CVIL (**a**.) ou la protéine GFP-DBCaM-CVIM (**b**.)

Les transformants, fraîchement repiqués, sont mis en présence de dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures afin d'induire la biosynthèse de la protéine fluorescente (GFP-DBCaM-CVIL ou GFP-DBCaM-CVIM) ; le FM4-64 (6.7 μ g/ml) est ajouté juste avant l'observation au microscope confocal (objectif x63). Les images ont été prises dans les minutes qui suivent l'ajout du marqueur rouge

(Les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent la membrane plasmique (MP) ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)





Fig. 1.48: Marquage des cellules transgéniques de tabac exprimant la protéine non isoprénylable GFP-DBCaM-C/S (a.) ou la protéine GFP (b.) avec le FM4-64

Après avoir été repiquées, les cellules TBY-2 sont mises en présence de dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures ; le marqueur rouge FM4-64 (6.7 μ g/ml) est ajouté juste avant l'observation au microscope confocal (objectif x63) ; les cellules sont numérisées dans les minutes qui suivent l'ajout du marqueur rouge

(Les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent la membrane plasmique (MP) ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)



Fig. 1.49: Plasmolyse des transformants stables en présence de FM4-64 La synthèse des protéines GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-C/S et de la protéine GFP est induite par addition de dexaméthasone 10 μM pendant 15 heures. Juste avant l'observation au microscope confocal, les cellules sont mises en présence de mannitol 0.45 M (dans les proportions 1:1) et de FM4-64 (6.7 μg/ml) (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent la membrane plasmique (MP) ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

Lorsque le FM4-64 est laissé au contact des cellules pendant 2 heures, une durée qui permet de mettre en évidence des structures ponctuées marquées, on peut constater que ces structures rouges colocalisent partiellement avec la faible fluorescence verte cytoplasmique des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM (**Fig. 1.50**).





Fig. 1.50: Internalisation du FM4-64 après 2 heures de mise en présence des transformants stables exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL (**a**.) ou GFP-DBCaM-CVIM (**b**.).

La biosynthèse des protéines de fusion GFP a été induite par ajout de dexaméthasone 10 μ M dans le milieu de culture ; une fraction est prélevée au bout de 15 heures et mise en présence du marqueur rouge FM4-64 (6.7 μ g/ml) pour une période de 2 heures.

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent la membrane plasmique (MP) ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

b.

6. Suivi de la localisation in vivo des protéines GFP isoprénylables au cours du cycle cellulaire

6.1 Simple synchronisation du cycle cellulaire

Les cellules TBY-2 ont la propriété de pouvoir être synchronisées (Nagata *et al.*, 1992; Kodama et Komamine, 1995) ce qui facilite l'étude des évènements liées aux différentes phases du cycle cellulaire.

Juste après repicage, les différentes lignées cellulaires exprimant les protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CVIL ont été mises en présence de DEX 30 μ M et d'aphidicoline pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite lavées pour éliminer l'aphidicoline (temps zéro), et remises en suspension dans un milieu neuf contenant de la DEX 30 μ M. Elles sont ensuite observées au microscope confocal toutes les heures.

6.2 Etudes spatio-temporelles de la distribution intracellulaire des protéines GFP au cours du cycle cellulaire

Des figures de division sont observables dans de très nombreuses cellules de la population cellulaire à partir des 14 heures après l'élimination de l'aphidicholine. C'est donc à ce moment que l'on a pu étudier la distribution dans les cellules en division (mitose et cytocinèse) des protéines GFP d'intérêt.

La localisation à la membrane plasmique des deux protéines isoprénylables ne change pas au cours de la mitose. La localisation nucléaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIM devient cytosolique. De plus, cette expérience a permis de mettre en évidence le marquage par la protéine GFP-DBCaM-CVIL et par la protéine GFP-DBCaM-CVIM d'une structure cellulaire particulière apparaissant en fin de mitose. La formation d'une telle structure en disque, centrale dans la cellule, et séparant le matériel génétique, laisse supposer qu'il s'agit de la plaque cellulaire (**Fig. 1.51, page 112** et 1**.52, page 113**). Cette structure n'est pas révélée par la protéine GFP-DBCaM-C/S (**Fig. 1.53, page 114**).



Fig. 1.51: Distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIM au cours du cycle cellulaire (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en rose ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; la barre blanche représente 10 µm (vue de la cellule) ou 5 µm (vue nucléaire)



Fig. 1.52 : Distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL au cours du cycle cellulaire (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent des régions d'intérêt ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)



G1

Fig. 1.53: Localisation intracellulaire de la fluorescence issue de la protéine non isoprénylable, GFP-DBCaM-C/S, au cours du cycle cellulaire

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent probablement les chromosomes nucléaires ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

La protéine non isoprénylable GFP-DBCaM-C/S, qui se localise exclusivement dans le noyau des cellules en interphase, devient cytosolique au moment de la mitose (**Fig. 1.53**), probablement du fait de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Cette protéine s'accumule aussi dans des structures localisées à l'emplacement du noyau et qui semblent correspondre, en lumière blanche, à des chomosomes condensés. Cette protéine GFP-DBCaM-C/S possède un domaine riche en résidus basiques qui pourraient intéragir avec l'ADN chromosomique. Après la mitose, la fluorescence verte se relocalise dans les deux noyaux fille.

Nous avons observé, que les cellules d'un même filament se divisent au même moment mais pas de façon synchrone. La figure 1.54 présente un exemple de cellules d'un même filament, exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, dans lesquelles il est possible de voir à la fois des figures de cytocinèse précoce et tardive.



Lorsque les cellules en cytocinèse, exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL ou GFP-DBCAM-CVIM sont mises en présence de FM4-64 (6.7 μ g/ml), la fluorescence de ce marqueur rouge colocalise avec la fluorescence verte, donnant une coloration jaune au niveau de la membrane plasmique, mais aussi au niveau de la plaque cellulaire (**Fig. 1.55** et 1.56, page 117).





Fig. 1.55: Localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIL (**a**.) ou GFP-DBCaM-CVIM (**b**.) en fin de cytocinèse et marquage des cellules TBY-2 avec le FM4-64 ($6.7 \mu g/ml$) (photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les flèches rouges indiquent la membrane plasmique (MP) ou la plaque cellulaire (PC) ; les points de repère sont en bleu ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)



Fig. 1.56: Distribution des protéines GFP (a.) et GFP-DBCaM-C/S (b.) (fluorescence verte) et du marquage FM4-64 (fluorescence rouge) au moment de la cytocinèse

La dexaméthasone (10 μ M) est introduite dans le milieu de culture de lignées transgéniques de cellules de tabac afin d'induire l'expression de la protéine GFP ou de la protéine GFP-DBCaM=C/S-cau-bout de 15 heures, une fraction cellulaire est prélevée et mise en contact avec le FM4-64 (6.7 μ g/ml) juste avant l'observation au microscope confocal (objectif x63)

(MP, membrane plasmique ; N, noyau ; PC, plaque cellulaire ; les points de repère sont en **rose** ; les flèches **rouges** indiquent la membrane plasmique ou la plaque cellulaire en formation ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)
La figure 1.57, qui présente une vue en coupe de la plaque cellulaire, montre que toute la surface de la plaque est colorée en jaune (vue selon l'axe rouge). L'observation de la



Fig. 1.57: Distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL et marquage de la cellule de tabac au FM4-64 Le marqueur rouge colocalise avec la fluorescence verte de la protéine GFP-DBCaM-CVIL au niveau de la membrane plasmique (MP) et au niveau de toute la surface de la plaque cellulaire (PC) comme le montre la vue obtenue selon l'axe rouge Les cellules transgéniques de tabac ont été synchronisées (synchronisation simple). La cellule observée a été numérisée 12 heures après lavage de l'aphidicholine

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les différentes vues ont été obtenues grâce à différentes coupes en Z («Z-stack») de la cellule ; la barre blanche représente 10 µm)

formation de la plaque cellulaire au cours du temps montre qu'elle se forme en 20 minutes environ. Ces expériences ont aussi permis de constater que la protéine GFP-DBCaM-CVIL est présente à des stades très précoces de formation de la plaque cellulaire (**Fig. 1.58, page 119-120** et 1.59, page 121).



Métaphase probable

Cytocinèse

Mitose

Fig. 1.58: Distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL et du marqueur FM4-64 au moment de la mitose et en début de cytocinèse dans une cellule TBY-2

(la barre blanche représente 10 µm ; les points de repère sont en bleu ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; MP, membrane plasmique ; t, temps)





Fig. 1.59: Observation de la distribution cellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (fluorescence verte) et du marquage rouge du FM4-64 dans une cellule transgénique de tabac au cours de la cytocinèse (« time-laps »)

La cellule est numérisée au microscope confocal (objectif x63) toutes les minutes. Le temps zéro de l'expérience (t=0, **Fig.** 1.58) correspond à l'observation d'un marquage vert (protéine GFP-DBCaM-CVIL) et rouge (FM4-64) diffus séparant le matériel nucléaire

(La barre blanche représente $10 \,\mu\text{m}$; les points de repère sont en **bleu**; t, temps; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski; MP, membrane plasmique; PC, plaque cellulaire)

6.3 La cytocinèse et la formation de la plaque cellulaire chez les plantes supérieures

Deux étapes successives, la mitose et la cytocinèse, mènent à la division d'une cellule mère en deux cellules filles. Les plantes supérieures ce processus impliquant la formation d'une plaque cellulaire, qui croît de manière centrifuge jusqu'à fusionner avec la membrane plasmique (pour revue : Verma, 2001). Ce compartiment extracellulaire est formé *de novo* à partir d'un flux de vésicules dérivées du Golgi. Le cytosquelette joue un rôle majeur dans cette étape en guidant ces vésicules vers le centre de la cellule où se forme la plaque cellulaire. Cet endroit est prédéterminé par une structure formée de microtubules corticaux et de filaments d'actine, appelée bande préprophasique (PPB, « PreProphase Bans ») (pour revue, Mineyuki, 1999). La mise en place du phragmoplaste (microtubules (Baskin et Cande, 1990; Asada *et al.*, 1991), filaments d'actine (Traas *et al.*, 1987 ; Baskin et Cande, 1990), éléments du RE (Hepler, 1982) et vésicules golgiennes) constitue la première étape de sa formation. Dans les cellules TBY-2, la formation de la plaque cellulaire s'effectuerait en cinq étapes majeures (Samuels *et al.*, 1995) (**Fig. 1.60, page 123**) :

1. La première étape consiste en la fusion de vésicules sécrétoires (SV, « Secretory Vesicles ») dérivées du Golgi au niveau du plan équatorial, après transport grâce aux microtubules orientés (MT, « Microtubules ») du phragmoplaste, alignés perpendiculairement au plan de la future plaque cellulaire (Euteneuer *et al.*, 1982 ; Baskin et Candle, 1990 ; Wick, 1991) ; un réseau particulier (FTN, « fusion Tube-generated network ») est généré à partir de tubes de fusion fins (FT, « Fusion Tubes »).

2. La transformation du réseau précédent en un réseau tubulo-vésiculaire délicat (TVN, « Tubulo-Vesicular Network ») est réalisée rapidement grâce à la formation de tubes fins (20±6nm), qui grandissent à partir de la fusion des vésicules individuelles ; le réseau est composé des bourgeons membranaires abondants formés de clathrine (CB, « clathrin-coated membrane bud »).

3. Lors de cette étape, le TVN est consolidé en un réseau tubulaire lisse (TN,« Tubular Network »), riche en callose et caractérisé par la présence de peu de bourgeons de clathrine; à ce stade, le réseau microtubulaire devient peu abondant contrairement au stade TVN.

4. A cette étape, la plaque cellulaire ressemble à une feuille fenestrée (FS, « Fenestrated Sheet ») ; elle possède des extrémités ressemblant à des doigts, tubes de fusions, qui rentrent en contact avec la zone d'adhésion (ZA, « Zone of Adhesion ») située sur la membrane plasmique de la cellule mère, au niveau de l'aire occupée par la bande préprophasique (PPB).

5. La maturation de la plaque cellulaire conduit à la fermeture des fenêtres et à la synthèse de cellulose.



Fig.1.60: Modèle de développement de la plaque cellulaire dans une cellule de plante supérieure établi par Samuels *et al.* (1995) (pour revue, Staehelin et Hepler, 1996)

La plaque cellulaire se forme en 5 étapes successives (1-5): (1) Fusion des vésicules dérivées du Golgi (FT, « membrane Fusion Tube » ; FM, «Fuzzy Matrix, ribosome-excluding phragmoplast matrix », matrice floue cytoplasmique ; SV, « Secretory Vesicle », vésicule sécrétoire ; MT, microtubule) (2) Formation d'un réseau tubulo-vésiculaire (CB, « clathrin-coated membrane bud » ; F, « Fuzzy coat ») (3) Formation d'un réseau tubulaire (4) Formation d'une feuille fenestrée (PCW, « Parent Cell Wall », paroi cellulaire mère ; FT, « Fusion Tube » ; ZA, « Zone of Adhesion », zone d'adhésion ; MP, membrane plasmique) (5) Formation de la nouvelle paroi cellulaire. L'étape sensible à un traitement à la cafféine est schématisée par une croix rouge (Samuels et Staehelin, 1996).

Afin de confirmer que les deux protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM se localisent bien à la plaque cellulaire des cellules TBY-2 en cytocinèse, nous avons choisi de perturber la formation de cette structure par addition de cafféine dans le milieu de culture des transformants.

6.4 Traitement des transformants stables à la cafféine

La cafféine (CAF) inhibe la formation de la plaque cellulaire au moment de la cytocinèse chez les plantes (Paul et Goff, 1973 ; Roper, 1977 ; Jones et Payne, 1978 ; Becerra et Lopez-Saez, 1978 ; Pareyre *et al.*, 1979 ; Gunning, 1982 ; Bonsignore et Hepler, 1985). Elle bloque spécifiquement le passage de l'étape 1 à l'étape 2 (**Fig. 1.60, page 123**) (Samuels et Staehelin, 1996) et peut provoquer la désintégration d'une plaque cellulaire incomplète, sans interférer avec la progression du cycle cellulaire (Samuels et Staehelin, 1996 ; Valster et Hepler, 1997). Deux types de cellules sont observées après traitement des cellules avec la CAF : des cellules mononuclées, c'est à dire des cellules qui ne se sont pas divisé pendant la durée du traitement, et des cellules binuclées qui résultent d'un processus de division cellulaire avortée.

Un traitement des transformants exprimant les protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CVIL avec 10 mM de CAF pendant 35 heures (Laporte *et al.*, 2003) (**Fig. 1.61, page 125**), conduit effectivement à l'observation de ces deux types cellulaires. Dans les cellules mononuclées ainsi que dans les cellules binuclées, la distribution des différentes protéines fluorescentes n'est pas perturbée. La protéine GFP se localise dans le cytosol et le nucléoplasme, la protéine GFP-DBCaM-C/S, dans le(s) noyaux et les deux protéines isoprénylables, dans la membrane plasmique (cellules mononuclées) et au niveau de la plaque cellulaire (cellules binuclées).

Différents stades de maturation de la plaque ont pu être observés dans les cellules binuclées (Fig. 1.62, page 126). On peut distinguer des fragments de plaque, bien individualisés ou en cours de désagrégation, ou encore pas de plaque du tout. Les deux protéines fluorescentes sont bien associées avec ces fragments de plaques. Aucun marquage vert n'est observé dans les cellules dans lesquelles la plaque est absente complètement. Les

éléments constitutifs de la plaque cellulaire sont donc nécessaires à l'association des protéines isoprénylées avec cette structure.



Fig. 1.61: Traitement des lignées de transformants stables à la cafféine 10 mM

Conditions de traitement (\mathbf{a}) et localisation intracellulaire en CLSM (objectif x63) de la protéine GFP (\mathbf{b} .), la protéine GFP-DBCaM-C/S (\mathbf{c} .), la protéine GFP-DBCaM-CVIM (\mathbf{d} .) ou la protéine GFP-DBCaM-CVIL (\mathbf{e} .) dans les cellules de tabac en interphase ou fin de cytocinèse-début de phase G1 traitées à la cafféine 10 mM

(CLSM, « Confocal Laser Scanning Microscopy »; la barre d'échelle correspond à 10 µm; CAF, cafféine; DEX, dexaméthasone; hPI, heures pré-induction; hpI, heures post-induction; 0, temps zéro de l'expérience; ME, milieu extracellulaire; V, vacuole; N, noyau; les flèches roses indiquent la membrane plasmique (MP) ou la plaque cellulaire (PC))

Fin cytocinèse/début G1



Fig. 1.62: Localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-C/S et GFP-DBCaM-CVIL exprimées dans des cellules de tabac en fin de cytocinèse/début de phase G1 traitées à la cafféine 10 mM (voir Fig. 1.61-a) pendant 35 heures.

- Le FM4-64 (6.7 µg/ml) est mis en présence des cellules au moment de l'observation en microscopie confocale (objectif x63)
- **a**. Cellules dont la plaque cellulaire n'est pas présente
- **b**. Cellules dans lesquelles la plaque cellulaire est en partie détruite
- c. Cellules dans lesquelles la plaque ressemble à un réseau particulier
- d. Cellules dont la plaque cellulaire est avortée mais semble avoir une morphologie normale

(PC, plaque cellulaire ; MP, membrane plasmique ; ME, milieu extracellulaire ; N, noyau ; les flèches **bleues** indiquent l'emplacement de la plaque cellulaire ; les flèches **rouges** indiquent la membrane plasmique ; la barre blanche représente 10 µm)

7. Un outil-test

Afin de pouvoir tester les effets d'inhibiteurs susceptibles d'intéragir avec la réaction d'isoprénylation, les lignées de transformants stables (exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-C/S, GFP) il a été nécessaire d'adapter le protocole utilisé précédemment (**Fig. 1.63** et 1.64, page 128).





Fig. 1.63: Schématisation du protocole mis au point afin de tester l'effet d'un ou deux composé(s) en simultané sur la distribution intracellulaire d'une protéine GFP d'intérêt

a. Les transformants stables TBY-2 sont repiqués hebdomadairement dans du milieu MS supplémenté frais (proportions 1:40)

b. L'expérience-test est composée de cinq étapes majeures

(MV, mévinoline ; FOS, fosmidomycine)

Le lancement d'une « expérience de test » débute toujours par le repiquage des quatre cultures de transformants (cellules de 7 jours) dans les proportions 1 : 4 (cellules en phase exponentielle de croissance) (**Fig. 1.63**). La concentration cellulaire de départ est donc 10 fois plus importante par rapport aux condition habituelles (1 : 40). Il a été montré que les cellules de plantes en culture produisent des substances dites « facteurs de conditionnement », qui sont

excrétées dans le milieu pour stimuler la croissance (Bellincampi et Morpurgo, 1991). En quantité plus importante, ces facteurs permettraient de stimuler les divisions cellulaires et la croissance de la culture, des paramètres favorables pour des études de métabolisme. La culture est ensuite répartie dans les différents puits d'une plaque à raison de 3 ml de milieu par puit. Ce volume est le volume minimal nécessaire pour recouvrir entièrement la surface du fond du puit pendant 48 heures, en tenant compte de l'évaporation, et éviter tout débordement du milieu lors de l'agitation de la plaque. L'avantage majeur de ce faible volume de culture vient du fait qu'il permet de minimiser le ou les volume(s) d'inhibiteur(s) ajouté(s) par puit. Après addition de l'inhibiteur, les cellules sont remises en culture sous agitation. Les dilutions de l'inhibiteur dans le milieu de culture végétal ont été réalisées en tenant compte du volume final de solvant (DMSO et/ou éthanol) qui a été toujours inférieur ou égal à 0,1 % (v/v). Dans tous les cas, une expérience contrôle est réalisée en parallèle mais ne contenant pas l'inhibiteur. La troisième étape, qui représente le temps zéro de l'expérience, est l'addition de la dexaméthasone dans le milieu de culture. Cette hormone stéroïde va provoquer la biosynthèse des protéines GFP d'intérêt. Les cellules sont laissées en contact avec l'inducteur et l'inhibiteur, pendant un temps choisi (en général 15 heures), appelé temps post-induction, avant d'être observées au microscope.

Le même protocole a été suivi pour chacune des substances testées (**Fig. 1.64**), les paramètres variables étant la concentration en inhibiteur et le temps de prétraitement.



Fig. 1.64: Schéma employé par la suite afin de traduire les conditions expérimentales utilisées lors du test de l'effet de chacune des substances inhibitrices étudiées sur la distribution intracellulaire de la fluorescence d'une protéine de fusion GFP isoprénylable (et essais de complémentation de l'inhibition)

Ce protocole a été utilisé, dans un premier temps afin de tester l'effet des deux solvants les plus couramment utilisés, à savoir l'éthanol (EtOH) (0,07%) et le

diméthylsulfoxide (DMSO) (0,07 %), sur la distribution intracellulaire des deux protéines isoprénylables (GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM). Les cellules TBY-2 sont mises en présence d'éthanol et de diméthylsulfoxide, trois heures avant l'introduction de DEX 10 μ M dans le milieu de culture. Les cellules sont observées au microscope confocal au bout de 15 heures. Ni l'éthanol, ni le DMSO, ne modifient la distribution intracellulaire des deux protéines isoprénylables. En effet, 90 % des cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, traitées ou non, ont une fluorescence verte associée à la membrane plasmique (**Fig. 1.65** et 1.66, page 130).



Fig. 1.65 : Effet des solvants éthanol (EtOH 0,07%) et diméthylsulfoxide (DMSO 0,07%) sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL

a. Conditions de traitement des cellules de tabac transformées stablement avec la séquence génétique codant pour la protéine GFP-DBCaM-CVIL (EtOH, éthanol ; DMSO, diméthylsulfoxide ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction)
b. Pourcentages de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation majoritaire à la membrane plasmique (MP, en bleu) par rapport à celles où la protéine géranylgéranylable a une localisation nucléaire et membranaire (MP+N, en orange) ; le contrôle correspond à des cellules induites et qui n'ont pas été mises en présence d'éthanol ou de diméthylsulfoxide

c. Répartition de l'intensité de la fluorescence émise par la protéine GFP-DBCaM-CVIL dans les cellules de tabac transformées. L'intensité de fluorescence est déterminée pour différentes parties de la cellule (ME, milieu extérieur à la cellule ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, Noyau ; Ca, cytoplasme) grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>). a. GFP-DBCaM-CVIL



EtOH 0,07%

DMSO 0,07%



EtOH 0,07%

DMSO 0,07%

Fig. 1.66 : Localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (a.) et de la protéine GFP-DBCaM-CVIM (b.) en présence des solvants éthanol ou diméthylsulfoxide

Les cellules transgéniques sont traitées à l'éthanol (EtOH 0,07%) ou avec le diméthylsulfoxide (DMSO 0,07%) 3 heures avant l'ajout de dexaméthasone 10 μ M dans le milieu de culture et sont observées au microscope confocal 15 heures post-induction (Images en fluorescence réalisées avec l'objectif x63 du microscope confocal ; la barre blanche représente 10 μ M)

8. GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, des protéines isoprénylées ?

Nous avons montré que les deux protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM se localisent majoritairement dans des structures membranaires, la membrane plasmique et la plaque cellulaire dans les cellules TBY-2. Afin de confirmer que ces deux protéines sont bien isoprénylées, nous avons choisi d'inhiber les prényl transférases de tabac (FTase et GGTase).

Il existe un nombre important d'inhibiteurs de prényl transférases animales du fait de leur action anti-cancéreuse (voir Introduction). Notre choix s'est porté sur trois inhibiteurs : un inhibiteur de géranylgéranyl transférase (le GGTI-2133) (Vasudevan *et al.*, 1999) et deux inhibiteurs de farnésyl transférase, le FTase-I (Cox *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1993) et le PFTI-I (Patel *et al.*, 1995). Le GGTI-2133 et le FTase-I sont des inhibiteurs de type CaaX-peptidomimétique, alors que le PFTI-I a une structure proche de celle du substrat isoprénique (FPP) (**Fig. 1.67, page 132**).

Les transformants stables ont été traités par le GGTI-2133 (10 ou 40 μ M), par le FTase-I (40 μ M) ou par le PFTI-I (10 ou 40 μ M) selon le protocole mis au point précédemment. Les cellules ont été mises en présence de l'inhibiteur 3 heures avant l'introduction dans le milieu de culture de DEX 10 μ M. Les TBY-2 sont observées après 15 heures.



Fig. 1.67: Structure des inhibiteurs de protéines prényl transférases utilisés dans ce travail

DBCaM-CVIM

c. Structure du farnésyl diphosphate (FPP)

d. La structure de l'inhibiteur de farnésyl transférase PFT inhibiteur-I (PFTI-I) est proche de celle du substrat isoprénoïde FPP

Les deux inhibiteurs de FTase ne modifient pas la distribution intracellulaire de la protéine farnésylable GFP-DBCaM-CVIM. Par contre, le GGTI-2133 a un effet visible sur la localisation cellulaire de la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL. Il augmente le

a. Structure des quatres aminoacides C-terminaux correspondants au motif CaaX des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP

b. Structure des inhibiteurs de géranylgéranyl transférase, le GGTI-2133, et de farnésyl transférase, le FTase inhibiteur-I (FTase-I): ces deux composés sont des inhibiteurs de type CaaX-peptidomimétique

nombre de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL se localise dans le noyau et la membrane plasmique (MP+N) (**Fig. 1.68, 1.69 page 134** et 1.70 **page 135**). En effet, une dose de 10 μ M, provoque une augmentation de 20 % du nombre de cellules ayant cette localisation MP+N, et une dose de 40 μ M, une augmentation supplémentaire de 30 % (**Fig. 1.68-b**). Dans ce cas, 70 % des cellules présentent une localisation fortement nucléaire (90 % de l'intensité de fluorescence) et faiblement membranaire (10 % de l'intensité de fluorescence).



Fig. 1.68: Effet du traitement des cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL par le GGTI-2133 10 μM ou 40 μM
a. Conditions de traitement des cellules (DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction)
b. Résultats statistiques obtenus après traitement des cellules, par comptage sous microscope confocal (objectif x20) des différents échantillons (traitement GGTI-2133 10 μM, 40 μM, contrôle non traité correspondant à des cellules juste induites) ; 395 cellules ont été comptées en moyenne pour chaque échantillon.

c. La répartition de la fluorescence dans les cellules traitées avec le GGTI-2133 10 ou 40 μ M, est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>) (voir matériel et méthodes)(ME, milieu Extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme).



GGTI-2133 40 μM



GGTI-2133 40 µM + MitoTracker

Fig. 1.69: Effet du GGTI-2133 40 μM sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL
a. Photo de microscopie confocale (objectif x63) d'une cellule représentative, traitée avec le GGTI 40 μM
b. Cellule traitée au GGTI-2133 40 μM et avec le MitoTracker qui permet de révéler les mitochondries (en rouge) La barre blanche représente 10 μm



en mitose

Fig. 1.70: Les cellules traitées au GGTI-2133 40 μM se divisent

Photos de microscopie confocale (objectif x63) de la distribution de la fluorescence verte issue de la protéine GFP-DBCaM-CVIL au cours du cycle cellulaire dans les échantillons traités avec le GGTI-2133 40 μ M

(les points de repère sont en rose ; les flèches roses indiquent probablement les chromosomes de la cellule ; DIC, contraste interférentiel différentiel (Nomarski))

Cette localisation nucléaire de la fluorescence démontre que le GGTI-2133 a inhibé la géranylgéranylation de la plupart des molécules de protéine GFP-DBCaM-CVIL, ce qui indique que cette protéine sert bien de substrat à une GGTase-I, pour la fixation d'une molécule de GGPP. La fluorescence membranaire résiduelle suggère une inhibition non totale de la réaction de géranylgéranylation. On ne peut exclure que la protéine GFP-DBCaM-CVIL soit partiellement isoprénylée par une FTase. C'est pourquoi, nous avons choisi de traiter les cellules exprimant cette protéine avec les deux inhibiteurs de FTase, le FTase-I et le PFTI-I.

Les cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL ont été traitées avec le FTase-I et le PFTI-I dans les mêmes conditions que précédemment (**Fig. 1.71-a, page 137**). Alors que l'inhibiteur FTase-I n'a pas d'effet, le PFTI-I a un effet sensible sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. A une dose de 40 μ M il augmente faiblement le nombre de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation nucléaire et membranaire de la fluorescence (MP+N) (**Fig. 1.71-b** et c), ce qui confirme qu'une petite partie des molécules de GFP-DBCaM-CVIL sont modifiées par une FTase.

Il est à noter que les cellules traitées avec le GGTI-2133 à une dose de 40 μ M sont dans un état physiologique satisfaisant comme l'atteste le marquage des mitochondries par le MitoTracker (**Fig. 1.69-b**).

L'ensemble de ces données indique que la protéine GFP-DBCaM-CVIL est bien le substrat d'une GGTase-I.







Fig. 1.71: Traitement des cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL avec l'inhibiteur de farnésyl transférase PFTI-I a. Conditions de traitement (DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction)

b. Expérience statistique mettant en évidence l'effet du PFTI-I sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL: 210 cellules ont été observées par échantillon (contrôle non traité, PFTI-I 10 μM ou PFTI-I 40 μM)

c. Distribution intracellulaire de la fluorescence verte sous l'effet d'une dose de 10 ou 40 μ M de PFTI-I: la distribution de la fluorescence dans les cellules TBY-2 traitées avec le PFTI-I 10 ou 40 μ M, est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>) (voir matériel et méthodes)(ME, milieu extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme).

c.

b.

Chapitre II

Utilisation de l'outil biologique

Partie 1

Transport intracellulaire des protéines GFP isoprénylables

1. Introduction

La thématique majeure de cette partie porte sur le trafic intracellulaire des protéines isoprénylées. Peu d'informations sont disponibles sur le(s) mécanisme(s), qui guident une protéine nouvellement isoprénylée vers sa ou ses destination(s) finale(s), où elle exercera sa ou ses fonction(s). Dans la partie précédente, nous avons observé que les protéines GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL, se localisent majoritairement au niveau de la membrane plasmique, dans les cellules TBY-2 en interphase, et à la plaque cellulaire, au moment de la cytocinèse. La question est maintenant de savoir comment ces protéines chimères, après leur biosynthèse, sont acheminées vers leur destination finale, à savoir la membrane plasmique et la plaque cellulaire. Chez les animaux, les données de la littérature ont permis de proposer plusieurs modèles de transport intracellulaire de protéines isoprénylées. Dans ce qui suit, nous présentons le cas du ciblage des petites GTPases monomériques Ras et des protéines hétérotrimériques G vers la membrane plasmique.

1.1 Trafic intracellulaire de protéines animales isoprénylées vers la membrane plasmique

a. Protéines Ras

Les protéines farnésyl transférases animales étant solubles, les Ras sont farnésylées dans le cytosol (Fig. 21.1-a, page 141) (Casey et Seabra, 1996). Les étapes suivantes d'endoprotéolyse et de carboxyl méthylation sont réalisées par des enzymes toutes deux localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique (Fig. 21.1-b et c) (Dai *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 1998; Ashby, 1998; Schmidt *et al.*, 1998). Ainsi, il est couramment admis que les protéines Ras, après avoir été prénylées, sont dirigées vers la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, pour y être modifiées, avant d'aller vers la membrane plasmique (Magee et Marshall, 1999; Choy *et al.*, 1999; Apolloni *et al.*, 2000).

Un deuxième type de signal, situé à proximité du tétrapeptide CaaX, dans une partie hypervariable de la protéine, consiste soit en un domaine polybasique soit en un ou plusieurs



Fig. 21.1: Schéma du système de transport à la membrane plasmique d'une protéine depuis son site d'isoprénylation établi selon des données obtenues dans le cas des protéines GTPases animales

Les protéines Ras sont synthétisées puis farnésylées (a). Attachées au RE, elles sont ensuite protéolysées (b) puis carboxyl méthylées (c) (Gutierrez *et al.*,1989). Elles suivent ensuite deux chemins possibles (1 ou 2): certaines, comme H-Ras, trafiquent vers la membrane plasmique *via* une voie sécrétoire (2), d'autres, comme K-Ras4B, transitent à travers le cytoplasme grâce au réseau microtubulaire (1). La protéine H-Ras est alors palmitoylée (d). L'association de K-Ras4B avec la membrane plasmique est favorisée par sa région polybasique (++) (e).

⁽PMT, palmitoyl transférase ; PTE, palmitoyl-thioestérase ; FTase, farnésyl transférase ; Rec1 ou Ste24, endoprotéases ; PCM, prénylcystéine α -carboxyl méthyltransférase)

motif(s) de palmitoylation. Ce second signal est nécessaire pour une localisation à la membrane plasmique des protéines Ras (Hancock et al., 1990 ; 1991b). Selon la nature de ce signal, les protéines Ras prénylées et méthylées sont dirigées vers deux voies de trafic distinctes (Fig. 21.1-1 ou 2). Des études ont montré que les protéines N-Ras et H-Ras, qui possèdent toutes les deux un site de palmitoylation en C-terminal (Fig. 21.3 page 144, H-Ras), sont ciblées vers la membrane plasmique grâce à une voie sensible à la bréfeldine A (BFA) (Fig. 21.1-2) (Choy et al., 1999). Le transport de H-Ras ferait intervenir des structures membranaires telles que l'appareil de Golgi (voie d'exocytose classique) (Apolloni et al., 2000). Par contre, une autre voie, insensible à un traitement à la BFA (Choy et al., 1999; Apolloni et al., 2000), faisant intervenir le réseau microtubulaire (Thissen et al., 1997) (Fig. 21.1-1), serait impliquée dans le transport de la protéine K-Ras4B vers la membrane plasmique. K-Ras4B possède un domaine polybasique mais pas de motif de palmitoylation (Fig. 21.3). C'est cette région basique en plus du groupe farnésyle de K-Ras4B qui permet une interaction avec les microtubules (Chen et al., 2000). Quand des cellules NIH-3T3 exprimant une GFP-K-Ras4B sont traitées avec du taxol, un agent qui déstabilise les microtubules, la protéine de fusion n'est plus localisée dans la membrane plasmique mais s'accumule dans le cytoplasme (Thissen et al., 1997). Ce traitement n'affecte pas la localisation cellulaire de GFP-H-Ras (Thissen et al., 1997) ou GFP-N-Ras (Chen et al., 2000).

b. Protéines G (Michaelson et al., 2002)

Les protéines hétérotrimériques G permettent la transduction de signaux à partir de récepteurs situés à la surface de la cellule vers des cibles intracellulaires. Pour assurer ce rôle, ces protéines doivent s'associer sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Les trois sous-unités G α , G β et G γ , composant l'hétérotrimère, sont synthétisées dans le cytosol. G α et G γ doivent subir des modifications post-traductionnelles, avant d'être capables de se fixer à la membrane plasmique (**Fig. 21.2, page 143**). Les sous-unités G α sont palmitoylées et les sous-unités G γ contiennent un motif CaaX. Dans un premier temps, les sous-unités G β et G γ s'associent pour former un dimère (**2**), puis, la cystéine du motif CaaX de G γ est prénylée (**3**) avant que le dimère se dirige vers le réticulum endoplasmique où s'effectuent les réactions d'endoprotéolyse (**4**) et de carboxyl méthylation (**5**). La formation du trimère G $\gamma\beta\alpha$ a lieu dans le Golgi (**6**). La sous-unité G α de cet hétérotrimère est palmitoylée (**7**). C'est une réaction essentielle pour le transport du trimère vers la membrane plasmique, transport qui

s'effectue *via* la voie de sécrétion classique (8). Comme dans le cas des protéines Ras, la localisation à la membrane plasmique des protéines G nécessite deux signaux, mais qui sont situés sur deux sous-unités différentes.



Fig. 21.2: Modèle de trafic des protéines G animales vers la membrane plasmique depuis leur site d'isoprénylation (d'après Michaelson *et al.*, 2002)

Les trois sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ sont synthétisées dans le cytosol au niveau de polysomes libres (1). Le sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$, qui présentent une grande affinité l'une pour l'autre, dimérisent immédiatement (2). $G\gamma$ est isoprénylée (3). La sous-unité $G\gamma$ du dimère $G\gamma\beta$ est ensuite protéolysée (4) et méthylée (5) au niveau de la face cytoplasmique de réticulum endoplasmique. $G\gamma\beta$ est ensuite délivré vers la face cytosolique du Golgi, où est aussi recruté $G\alpha$. L'hétérotrimère est formé (6). La sous-unité $G\alpha$ serait palmitoylée grâce à une acyl transférase golgienne (7). Cette acylation permettrait à l'hétérotrimère d'être transporté vers la membrane plasmique *via* une voie de sécrétion classique (8).

(MP, membrane plasmique ; PTase, isoprényl transférase ; Rce1 ou Ste21, endoprotéases ; PCM, prénylcystéine α -carboxyl méthyltransférase)

1.2 Stratégie mise en place pour l'étude du transport intracellulaire d'une protéine

végétale isoprénylable vers la membrane plasmique

Comme la protéine K-Ras4B, les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM possèdent en C-terminal une séquence CaaX et un domaine basique (**Fig. 21.3**), dont

Protéine	Séquence C-terminale
K-Ras4B H-Ras	Domaine basique REIRKHKEKMSKDGKKKKKKSKTK VIM GPGCMSCK VLS
GFP-DBCaM-CVIL GFP-DBCaM-CVIM	Domaine basique Séquence peptidique de la GFP VKCMMAKKRRKRIEE-KREHDGGSRTKSAGPSAAPASKRGQK_VII Séquence peptidique de la GFP VKCMMAKKRRKRIEE-KREHDGGSRTKSAGPSAAPASKRGQK_VIM

Fig. 21.3: Extrémités C-terminales des protéines animales K-Ras4B et H-Ras (homme) et des protéines isoprénylables GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM. Les sites de palmitoylation de H-Ras sont indiqués par des cystéines (en violet dans la séquence)

(Les résidus basiques sont en rose ; K, lysine ; R, arginine)

nous venons de voir l'importance dans le ciblage de K-Ras4B à la membrane plasmique. Le domaine basique de K-Ras4B est constitué de 12 lysines et 2 arginines et celui provenant de OsCaM61, 7 lysines et 6 arginines parmi 38 résidus. La séquence protéique de K-Ras4B se termine par un motif CaaX de type –CVIM, et celle des protéines GFP isoprénylables, par un motif -CVIL ou -CVIM. On peut donc supposer que le transport intracellulaire des protéines géranylgéranylables GFP-DBCaM-CVIL et farnésylables GFP-DBCaM-CVIM, exprimées de façon stable, dans les cellules TBY-2, s'effectue d'une manière similaire à celui des protéines K-Ras4B dans les cellules animales, c'est-à-dire selon une voie qui met en jeu les microtubules et qui est insensible à la BFA (**Fig. 21.1-1**). Notre démarche a donc été de vérifier cette hypothèse. Nous avons testé les effets d'un traitement déstabilisant le réseau microtubulaire et de la BFA sur la localisation intracellulaire des protéines isoprénylables fluorescentes dans les cellules TBY-2 en interphase. Les mêmes expériences ont été conduites avec transformants stables en cytocinèse afin d'étudier le trafic intracellulaire des protéines isoprénylables vers la plaque cellulaire, pour lequel il existe très peu de données.

2. Les microtubules et le trafic intracellulaire des protéines de fusion GFP isoprénylables

Afin de tester l'intervention possible du réseau microtubulaire dans le trafic et la localisation cellulaire de nos différentes protéines GFP d'intérêt, nous avons utilisé des composés agissant sur les microtubules : le taxol et l'oryzaline (**Fig. 21.4**). Quatre lignées



Fig. 21.4: Hypothèse de l'intervention du réseau microtubulaire (1) dans le ciblage à la membrane plasmique d'une protéine GFP isoprénylable possédant un domaine basique (++) suivi d'un motif CaaX (PTase, protéine isoprényl transférase)

cellulaires de transformants stables de tabac ont été utilisées, exprimant, en présence de dexaméthasone, les deux protéines isoprénylables GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, la protéine GFP et la protéine GFP-DBCaM-C/S (contrôles).

2.1 Le taxol

a. Traitement des cellules au taxol

Le taxol (TAX) est une drogue qui stabilise les microtubules en diminuant la concentration critique de tubuline nécessaire pour la polymérisation *in vitro* (Schiff *et al.*, 1979). Dans les cellules de plantes supérieures en culture, il a été montré que le taxol se fixe sur la région N-terminale de la β -tubuline, entraînant la formation de microtubules stables, qui ne peuvent plus se polymériser (Weerdenburg *et al.*, 1986).

Yasuhara et coll. (1993) ont montré qu'un traitement des cellules de TBY-2 par 20 μ M de taxol pendant 30 à 60 minutes inhibe la formation de la plaque cellulaire et du phragmoplaste. Par ailleurs, avec le même matériel, il a été montré que le taxol administré à une concentration de 2 μ M pendant 24 heures provoque une augmentation du nombre de cellules multinuclées (Laporte *et al.*, 2003). Comme décrit dans le chapitre précédent, un temps d'induction de 15 heures est nécessaire pour observer une localisation à la membrane plasmique de la protéine GFP-DBCaM-CVIL dans la majorité des cellules. Les conditions de traitement utilisées par Laporte et coll. (2003) apparaissent comme plus appropriées à la réalisation de notre objectif. Ainsi nous avons choisi de traiter les transformants stables avec 2 μ M de taxol pendant 18 heures. L'inhibiteur a été ajouté dans le milieu de culture cellulaire 3 heures avant l'induction, par la dexaméthasone 10 μ M de la biosynthèse des différentes protéines GFP (**Fig. 21.5-a, page 147**). Dans ces conditions on peut supposer que les microtubules seront stabilisés avant la synthèse des protéines d'intérêt, farnésylable ou géranylgéranylable, dont la fluorescence peut être détectée dès 2-3 heures après l'ajout de l'inducteur.



Fig. 21.5: Traitement des transformants stables TBY-2 par le taxol 2 μ M

Conditions de traitement (**a**. hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction ; DEX, dexaméthasone ; 0, temps zéro de l'expérience) et photos des cellules traitées exprimant les protéines GFP (**b**.), GFP-DBCaM-C/S (**c**.), GFP-DBCaM-CVIM (**d**.) ou GFP-DBCaM-CVII (**e**.). Ces images ont été réalisées grâce au microscope confocal (objectif x63) et correspondent à la superposition des images obtenues en fluorescence et lumière blanche (la barre blanche représente 10 μ m; les flèches **roses** indiquent la membrane plasmique (MP) ou la plaque cellulaire (PC) ; ME, milieu extracellulaire).

b. Distribution intracellulaire des différentes protéines GFP dans des cellules traitées au taxol

Comme montré par la figure 21.5, le traitement des différentes lignées cellulaires avec du taxol 2 μ M ne modifie pas la localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-C/S ou GFP, que les cellules soient en interphase ou en cytocinèse. En effet, en présence de taxol, les deux protéines GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CVIL restent localisées majoritairement au niveau de la membrane plasmique (**Fig.** 21.5-d et e) et la protéine non isoprénylable, GFP-DBCaM-C/S, au niveau du noyau des cellules en interphase (**Fig.** 21.5-c). Le taxol ne semble donc pas interférer avec le transport intracellulaire de ces protéines, contrairement aux observations réalisées dans le cas de K-Ras4B, ce qui exclut une participation des microtubules dans le ciblage à la membrane plasmique.

Dans les cellules en cytocinèse, on observe deux noyaux, en accord avec les observations de Laporte et coll. (2003), ce qui reflète un effet du taxol. Dans les TBY-2 exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, une fluorescence intense apparaît au niveau de la plaque cellulaire, en plus de celle associée à la membrane plasmique (**Fig. 21.5-e** et d). Dans les cellules de tabac exprimant la protéine GFP-DBCaM-C/S aucun marquage de la plaque cellulaire n'est observé (**Fig. 21.5-e**). D'après les observations de Gu et Verma (1997), l'addition de taxol à des cellules dans lesquelles la plaque cellulaire a été initiée, provoque l'arrêt de croissance de cette plaque. La stabilisation des microtubules centraux du phragmoplaste par le taxol empêcherait leur dépolymérisation ainsi que leur repolymérisation aux extrémités de la plaque en formation bloquant ainsi le flux de vésicules nécessaire à sa formation (Samuels *et al.*, 1995 ; Gu et Verma, 1996). La présence des deux noyaux reformés atteste que le cycle cellulaire s'est poursuivi malgré l'avortement de la croissance de la plaque cellulaire. L'observation de cette plaque dans les cellules binucléées semble indiquer que l'effet du taxol n'a pas été immédiat.

2.2 L'oryzaline

a. Conditions de traitement

L'oryzaline (ORY) est un herbicide, qui se lie à la tubuline, et inhibe la polymérisation des microtubules, entraînant ainsi un arrêt du cycle cellulaire en métaphase (Morejohn *et al.*, 1987 ; Hugdahl et Morejohn, 1993). Ce composé qui a été utilisé à une concentration de 6,7 μ M a été mis en présence des cellules 3 heures avant l'induction de la synthèse des différentes protéines fluorescentes (GFP, GFP-DBCaM-C/S, GFP-DBCaM-CVIL ou GFP-DBCaM-CVIM) par la dexaméthasone 10 μ M (**Fig. 21.6-a**). Comme dans le cas du taxol, les cellules



Conditions de traitement des transformants stables (a. hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction ; 0, temps zéro de l'expérience ; ORY, oryzaline ; DEX, dexaméthasone) et observation de la distribution intracellulaire des protéines GFP (b.), GFP-DBCaM-C/S (c.), GFP-DBCaM-CVIM (d.) et GFP-DBCaM-CVII. (e.) exprimées dans les cellules traitées. Les TBY-2 sont observées en microscopie confocale (objectif x63) et numérisées après un traitement à l'oryzaline 6,7 μ M d'une période de 18 ou 39 heures (la barre blanche représente 10 μ m ; les flèches rosses indiquent la membrane plasmique (MP)) ont donc été prétraitées dans le but d'induire la modification du réseau microtubulaire avant la biosynthèse des protéines GFP fluorescentes. Les cellules ont ainsi été laissées en contact avec l'herbicide durant une période totale de 18 heures.

b. Effets de l'oryzaline sur la localisation des protéines d'intérêt

Un des effets visibles provoqué par l'administration de l'oryzaline dans le milieu de culture des transformants stables, est l'observation de cellules dont le cycle est bloqué en métaphase. Ainsi, dans les cellules exprimant la protéine GFP, il est possible d'observer, des structures qui font penser à des chromosomes condensés, qui ne sont pas fluorescents (**Fig.** 21.7-a). A ce stade du cycle cellulaire, la protéine GFP-DBCaM-C/S semble, elle, associée à
a. GFP

Cellules traitées à l'oryzaline 6,7 µM en métaphase probable



b. GFP-DBCaM-C/S



Fig. 21.7: Localisation intracellulaire des protéines GFP (**a**.) et GFP-DBCaM-C/S (**b**.) exprimées dans des cellules en métaphase probable traitées à l'oryzaline 6,7 μ M. Le temps d'induction étant de 15 heures, la durée totale du traitement à l'oryzaline est de 18 heures (voir Fig. 21.6-a.).

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère, situés à l'emplacement du noyau cellulaire, sont en **rose** ; la barre blanche représente 10 µm ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; V, vacuole ; ME, milieu extracellulaire)

ces chromosomes condensés (**Fig. 21.7-b**). La figure 21.6-d et *e* montre que dans les cellules en interphase, l'oryzaline n'affecte pas la localisation des protéines GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL, qui restent associées majoritairement au niveau de la membrane plasmique. De même, dans les cellules en interphase, la GFP reste cytosolique et nucléoplasmique (**Fig. 21.6-b**) et la protéine non isoprénylable, GFP-DBCaM-C/S, exclusivement nucléaire (**Fig. 21.6-c**). De plus longs prétraitements à l'oryzaline 6,7 μ M, d'une durée de 24 heures, ne perturbent pas non plus le transport à la membrane plasmique des protéines isoprénylables. Pour ces durées de contact plus longues, la morphologie des cellules est modifiée ; elles apparaissent plus rondes après 39 heures de traitement avec cet herbicide (**Fig. 21.6-e**). Le trafic intracellulaire des protéines fluorescentes, isoprénylables (GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL) ou non (GFP-DBCaM-C/S), n'est donc pas perturbé lorsque les microtubules sont stabilisés. De telles observations suggèrent que le réseau de microtubules ne participe pas au transport de ces protéines isoprénylables ou non.

2.3 Conclusion

Il apparaît donc que le réseau microtubulaire n'est pas directement impliqué dans le trafic de nos deux protéines fluorescentes vers la membrane plasmique. Qu'elles soient farnésylable ou géranylgéranylable, elles doivent donc être transportées *via* une autre voie intracellulaire, indépendante du taxol et de l'oryzaline, et différente de celle empruntée par les protéines K-Ras4B. Cette voie pourrait être celle du système endomembranaire.

3. Le système endomembranaire et les protéines isoprénylées

3.1 Introduction

Dans les cellules eucaryotes, le système endomembranaire est constitué du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi (Golgi), des vacuoles et de la membrane plasmique (**Fig. 21.8**). Ces quatre structures cellulaires constituent une machinerie, qui assure un trafic de protéines et de lipides grâce à différents types de vésicules pouvant emprunter des voies différentes (pour revue, Kepes *et al.*, 2005). Ces vésicules sont de trois types majeurs : les vésicules de clathrine (CCV), les vésicules de COP (COP) et les vésicules denses (DV) (**Fig. 21.8**).



Fig. 21.8: Schématisation des voies de transport intracellulaires connues et potentielles (indiquées par un point d'interrogation, **?**) entre les composants du système endomembranaire de plantes (d'après Hawes *et al.*, 1999 ; Battey *et al.*, 1999 ; Nebenführ, 2002) (PAC, « precursor accumulating vesicle » ; PSV, « protein storage vacuole » ; DV, « dense vesicle », vésicule dense ; COPI et COPII, « coat protein I and II » ; TGN, « *trans*-Golgi network », réseau *trans*-golgien ; CCV, « clathrin-coated vesicle », vésicule de clathrine ; PVC, « prevacuolar compartiment pré-vacuolaire ; pcr, « partially-coated reticulum » ; LV, « lytic vacuole », vacuole lytique ; CCP, « Clathrin-coated pit » ; OV, « Osmotic Vesicle » ; SV, « secretory vesicle », vésicule sécrétoire)

3.2 Système endomembranaire et protéines Rab

Chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes, les mécanismes qui sont impliqués dans la formation des vésicules à partir du RE et du Golgi semblent être conservés. Ils font intervenir deux types de petites GTPases, les protéines Sar1p et Arf1p (Arf, «ADP ribosylation factor»), qui permettent la formation des complexes protéiques de type COP (« coat protein complex »). Sar1p participerait au recrutement du complexe protéique COPII au niveau du RE, grâce au facteur GEF Sec-12p (GEF, «Guanine nucleotide exchange factor ») (Bar-Peled et Raikhel, 1997; Andreeva et al., 1998; Movafeghi et al., 1999; Andreeva et al., 2000; Phillipson et al., 2001), alors que Arf1p, activée par le facteur GEF Sec-7, serait la GTPase nécessaire à l'assemblage, dans le Golgi, du futur manteau de COPI (Pimpl et al., 2000). Ces deux types de GTPases auraient la propriété de réguler le processus de « tetheringdocking » des vésicules de COPI et II sur leur membrane cible. La spécificité du processus de « docking-fusion » des vésicules avec leur membrane cible dépendrait des protéines membranaires SNAREs (récepteurs SNAP, «Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factorattachment protein») présentes sur le transporteur vésiculaire (v-SNARE) et sur la membrane cible (t-SNARE) (Fig. 21.10, page 157). Les SNAREs agiraient en coopération avec les GTPases Rab/Ypt (pour revue, Sanderfoot et al., 2000). Il a ainsi été montré que les protéines AtRab1b et NtRab2 sont impliquées dans le transport RE-Golgi (Batoko et al., 2000 ; Cheung et al., 2002). D'autres GTPases joueraient un rôle plus en aval du système endomembranaire. A la sortie du trans-Golgi, les vésicules peuvent emprunter plusieurs voies : soit vers les vacuoles, soit vers la membrane plasmique. La voie partant du Golgi et allant à la membrane plasmique est appelée voie exocytique. Cette voie assure, entre autres, le transport vers la surface cellulaire de précurseurs de la paroi (Fig. 21.8) (Battey et al., 1999 ; Béraud-Dufour et Balch, 2002). Ces précurseurs, qui sont constitués de polysaccharides et de protéines (Moore et al., 1991; Lynch et Staehelin, 1992), sont élaborés au niveau de l'appareil de Golgi, puis séquestrés dans des vésicules sécrétoires (SV) (Driouich et al., 1993). La composition du cargo et de la membrane de ces vésicules reste encore largement inconnue. Certaines des protéines Rab/Ypt seraient impliquées dans le processus d'exocytose et d'autres dans celui d'endocytose. Chez Saccharomyces cerevisiae, Sec4p, une protéine Ypt, régule la fusion des vésicules à la membrane plasmique (Goud et al., 1988) et son homologue, chez Schizosaccharomyces pombe, Ypt2p, est requis pour le transport entre le Golgi et la membrane plasmique (Craighead et al., 1993). L'homologue de mammifère, la protéine Rab8, joue aussi un rôle dans le trafic allant du réseau trans-golgien (TGN, « trans-Golgi network ») vers la membrane plasmique (Huber et al., 1993). Des homologues de plantes sont connus et plus similaires à Rab8 et Ypt2p qu'à Sec4p.

Le génome d'Arabidopsis contient au moins 57 GTPases Rab/Ypt classées en 8 sousgroupes (Rab1, Rab2, Rab5, Rab6, Rab7, Rab8, Rab11 et Rab 18). Plus de la moitié de ces Rabs, de part leur structure conservée et leurs homologies de séquences avec les Rabs animales, pourraient être impliquées dans le mécanisme d'endocytose. Par exemple, la famille de GTPases Rab11 comprend 26 membres, qui semblent avoir, en raison de leur localisation intracellulaire, une fonction située à l'interface de la voie endocytique et de la voie sécrétoire ou de la voie vacuolaire. Pra2 et Pra3, deux GTPases de pois, homologues de certains membres de la famille Rab11, ont des distributions cellulaires distinctes ; Pra2 est localisée dans le Golgi et les endosomes, alors que Pra3 est présente dans le compartiment prévacuolaire (PVC, « prevacuolar compartment ») ou le réseau trans-golgien (Inaba et al., 2002). Presque toutes les protéines Rabs végétales isolées jusqu'à présent possèdent des cystéines C-terminales isoprénylables, comme leurs homologues du domaine animal (Desnoyers et al., 1996), ainsi qu'une région hypervariable, adjacente au motif d'isoprénylation, qui joue un rôle important pour la localisation correcte de ces Rabs. Il a été montré récemment que la double géranylgéranylation des Rabs semble requise pour la localisation de ces protéines à leur membrane cible (Calero et al., 2003). La double géranylgéranylation a donc une grande importance dans la fonction de ces GTPases, qui dépend étroitement de leur localisation (Calero et al., 2003). Une des exceptions est Ara6, qui fait partie du groupe des GTPases Rab5, mais qui ne possède pas de cystéine isoprénylable ni de région hypervariable (Ueda et al., 2001); dans ce cas, l'ancrage à la membrane serait assuré par des sites de myristoylation et de palmitoylation situés dans la région N-terminale. Ara6 est localisée dans une population particulière d'endosomes (Ueda et al., 2001). Une autre exception est la protéine m-Rab_{mc}; cette GTPase ne possède pas de motif de prénylation mais est myristoylée et semble impliquée dans une voie de transport spécifique aux plantes, menant aux prévacuoles, qui donneront des vacuoles lytiques (Bolte et al., 2004a).

3.3 Hypothèse d'un transport via une voie exocytique

Comme nous venons de le voir, il existe des protéines végétales isoprénylées, les Rabs, qui interagissent avec les composants du système endomembranaire. Il nous a donc semblé intéressant de tester si nos protéines d'intérêt GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CVIL pouvaient être transportées *via* une voie sécrétoire (**Fig. 21.9**). Dans ce but, les différentes

lignées de transformants stables ont été traitées par la bréfeldine A, un agent déstabilisant le Golgi (¶ 4) (Fig. 21.9).



Fig. 21.9: Deuxième hypothèse (**2**): intervention du système golgien dans la localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM (BFA, bréfeldine A ; PTase, isoprényl transférase)

Dans les cellules végétales, il a été montré que les filaments d'actine pouvaient intervenir dans le transport de vésicule depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Taylor et Hepler, 1997; Battey et Blackbourn, 1993). Ce transport est inhibé par la

cytochalasine D. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'action de ce composé en plus de celle de la BFA sur le transport de nos protéines isoprénylables dans les différentes lignées de TBY-2 (¶ 5) (Fig. 21.20, page 169).

4. Utilisation de la bréfeldine A

4.1 Généralités

Chez les mammifères et les levures, la cible moléculaire de la BFA a été identifiée comme étant le facteur GEF Sec-7 (Peyroche *et al.*, 1999 ; Robineau *et al.*, 2000 ; Jackson et Casanova, 2000). L'addition de BFA entraîne toute une cascade de conséquences : Arf1 n'est plus activé, il n'y a plus de recrutement des protéines formant le manteau des vésicules de COP, le Golgi se redistribue dans le RE. Il en résulte une inhibition de la formation des vésicules de COP qui entraînerait un blocage des voies sécrétoires associées. Chez les plantes, la morphologie du Golgi est également altérée par un traitement BFA (pour revues,

Satiat-Jeunemaitre *et al.*, 1996 ; Nebenführ *et al.*, 2002), qui entraîne, selon le type de cellules, la formation de « compartiments BFA » et/ou de « compartiments hybrides RE-Golgi » (**Fig. 21.10, page 157**). Les « compartiments BFA » ont été observés, par exemple, dans les cellules de racines de maïs (Satiat-Jeunemaitre et Hawes, 1992, 1993). Ce sont des structures membranaires compactes, localisées dans le cytosol, de préférence à la périphérie du noyau. Elles sont formées par l'agrégation de saccules golgiens et de vésicules d'origine golgienne. Ritzenthaler et coll. (2002) ont décrit l'action de la BFA sur les cellules TBY-2 (**Fig. 21.11, page 158**). Après un traitement de 5 minutes avec une concentration finale de 10 µg/ml (soit 35,7 mM) de BFA, on observe la perte des protéines du manteau de COP-I. Durant les 10-15 minutes suivantes, la BFA induit une série de changements dans l'architecture du Golgi, tels que la fusion des citernes golgiennes avec le RE. Après 15 à 60 minutes, un « compartiment hybride RE-Golgi » est formé. Après un temps de 30 à 60 minutes, il est aussi possible d'observer la formation de « compartiments BFA » (**Fig. 21.11**).



Fig. 21.10: Un traitement à la bréfeldine A peut conduire à la formation de deux structures particulières dans les cellules végétales: le « compartiment BFA » et/ou le « compartiment hybride RE-Golgi » ; les sites d'action hypothétiques de la BFA sont schématisés par une croix rouge (d'après Nebenführ *et al.*, 2002 ; Nebenführ, 2002)

(BFA, bréfeldine A; SNARE, « soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptor »; COPI et COPII, « coat protein I and II »; cis, *cis*-Golgi ; Med, Golgi médian ; trans, *trans*-Golgi ; TGN, « *trans*-Golgi network », réseau *trans*-golgien)



Cellule de tabac BY-2

Fig. 21.11: Effets de la bréfeldine A (10 µg/ml) en fonction du temps de traitement des cellules TBY-2 (d'après Ritzenthaler *et al.*, 2002) (BFA, bréfeldine A ; min, minute(s) ; COP-I, « coat protein I »)

Une exposition de plusieurs heures (5 heures) des cellules TBY-2 à la BFA, conduit à une transformation du « compartiment hybride RE-Golgi » en une structure « pathologique ».

4.2 Conditions de traitement des cellules TBY-2 à la BFA

Nous avons choisi de traiter les transformants stables exprimant nos protéines d'intérêt avec une concentration de BFA identique à celle utilisée dans l'étude réalisée par Ritzenthaler et coll. (2002) (soit 10 μ g/ml). La BFA est mise en présence de cellules fraîchement repiquées (dans les proportions 1:4), 3 heures avant l'ajout de dexaméthasone 10 μ M dans le milieu de culture (**Fig. 21.12**). Ainsi, au moment de l'induction de la biosynthèse des protéines d'inté-



Fig. 21.12: Conditions de traitement des transformants stables TBY-2 à la bréfeldine A et schématisation des effets majeurs pouvant être causés par cet inhibiteur au bout d'une heure d'action (soit 1 hPI) (selon Ritzenthaler *et al.*, 2002). (hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction ; 0, temps zéro de l'expérience ; BFA, bréfeldine A ; DEX, dexaméthasone)

rêt, la BFA aura exercé les différents effets séquentiels décrits par Ritzenthaler et coll. (2002) sur le Golgi, aboutissant à l'inactivation de ses fonctions sécrétoires. Les cellules traitées dans ces conditions sont observées sous microscope confocal 15 heures après l'ajout de dexaméthasone dans le milieu de culture (**Fig. 21.12**). Notre étude a porté à la fois sur les cellules en interphase et sur des cellules situées dans une phase de cytocinèse tardive-début de phase G1.

4.3 Observation des effets de la bréfeldine A sur le transport intracellulaire des protéines d'intérêt dans les cellules TBY-2

Comme illustré dans les figures 21.13 (cellules en interphase) et 21.14 (page 161) (cellules en cytocinèse-début de phase G1), le traitement par la BFA n'affecte pas la distribution cellulaire de la protéine GFP, ni celle de la protéine GFP-DBCaM-C/S. La pro-



Fig. 21.13: Cellules TBY-2 en interphase exprimant les protéines GFP (**a**.), GFP-DBCaM-C/S (**b**.), GFP-DBCaM-CVIM (**c**.) et GFP-DBCaM-CVIL (**d**.), en présence (cellules à droite) ou non (cellules à gauche) de bréfeldine A 10 µg/ml (conditions de traitement, voir **Fig. 21.12**)

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les flèches **roses** représentent des amas de fluorescence localisés dans le cytoplasme cellulaire ; les flèches **bleues** indiquent la membrane plasmique (MP) ; la barre d'échelle blanche représente 10 μ m)



Fig. 21.14: Cellules de tabac en fin de cytocinèse-début de phase G1 traitées à la bréfeldine A pendant 18 heures L'induction de la biosynthèse des protéines GFP (**a**.), GFP-DBCaM-C/S (**b**.), GFP-DBCaM-CVIM (**c**.) ou GFP-DBCaM-CVIL (**d**.) a été réalisée, par ajout dans le milieu de culture de dexaméthasone 10 μ M, pour une durée de 15 heures, après trois heures de prétraitement par l'inhibiteur bréfeldine A (10 μ g/ml)

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; la barre blanche représente 10 μ m ; les flèches roses indiquent l'emplacement de la plaque cellulaire (PC) ou de la membrane plasmique (MP))

téine GFP reste localisée dans le cytosol et le nucléoplasme et la protéine non isoprénylable GFP-DBCaM-C/S reste associée au noyau, indiquant que son transfert à ce site est insensible à la BFA et n'implique aucune participation du Golgi. Les cellules exprimant la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL ou farnésylable GFP-DBCaM-CVIM, traitées dans les mêmes conditions, ont été observées en interphase (**Fig. 21.13**) ou en cytocinèse (**Fig.**

21.14). Ces deux protéines restent associées à la membrane plasmique. Or, au moment de la synthèse de ces protéines isoprénylables, l'appareil de Golgi présentait déjà une structure altérée. Ceci indique que l'altération de la morphologie du Golgi et de ses fonctions sécrétoires, n'a pas eu d'effet sur le trafic vers la membrane plasmique des protéines farnésylables ou géranylgéranylables. Les deux protéines d'intérêt ne semblent donc pas transiter *via* le Golgi ou emprunter une voie sécrétoire mettant en jeu le Golgi. Cependant, dans les cellules traitées (**Fig. 21.15-b** et c), l'intensité de la fluorescence membranaire est

a. Cellule non traitée



b. Cellule mononuclée traitée à la bréfeldine A





c. Cellule binuclée traitée à la bréfeldine A





Fig. 21.15: Répartition intracellulaire de la fluorescence verte émise par la protéine GFP-DBCaM-CVIL dans des cellules TBY-2 traitées ou non à la bréfeldine A

légèrement plus faible et celle, du cytoplasme, plus importante, comparativement à la situation observée dans les cellules non traitées (**Fig. 21.15-a**). Dans les cellules non traitées, 81 % de l'intensité de fluorescence émise par la protéine GFP-DBCaM-CVIL sont associés à la membrane plasmique et 18 % au cytoplasme ; dans les cellules traitées, ces mêmes valeurs sont respectivement, en moyenne, de 63 % et de 30% (**Fig. 21.15**). Il semblerait donc que le traitement à la BFA modifie sensiblement la distribution intracellulaire de la fluorescence au

Les cellules transgéniques de tabac sont traitées pendant 3 heures à la bréfeldine A 10 μ g/ml avant d'être mises en présence de dexaméthasone 10 μ M pour une durée de 15 heures (**b**. et **c**.) ; l'échantillon non traité (**a**.) correspond à des cellules mises en présence de dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures. Les images ont été réalisées grâce au microscope confocal (objectif x63). L'intensité de fluorescence répartie dans chaque partie cellulaire (V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme) et celle du milieu extracellulaire (ME) est calculée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>) (voir matériel et méthodes).

profit du cytoplasme. Les protéines GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL sont partiellement « retenues » dans le cytoplasme sous forme de structures particulières, fortement fluorescentes, avec une taille voisine de 5 μ m, en réponse à la BFA (**Fig. 21.13, page 160** et **Fig. 21.16**, flèches roses). Afin de vérifier que ces structures ne résultent pas d'une invagina-



Fig. 21.16: Cellule TBY-2 transgénique en interphase exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL en présence de bréfeldine A 10 µg/ml. Les flèches **roses** indiquent les structures cytoplasmiques particulières d'environ 5 µm fortement fluorescentes. (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; MP, membrane plasmique ; V, vacuole ; ME, milieu extracellulaire)

tion de la membrane plasmique, les cellules transgéniques traitées à la BFA ont été mises en contact du marqueur de la membrane plasmique FM4-64. Le marqueur rouge co-localise au niveau de la membrane plasmique avec la fluorescence verte de la protéine géranylgéranylable ou farnésylable, d'où l'observation d'une fluorescence jaune. Les structures particulières, qui sont situées à la périphérie de la cellule, restent colorées en vert et ne résultent donc pas d'une invagination de la membrane plasmique sous l'effet de la BFA (**Fig. 21.17**).



Fig. 21.17: Cellule TBY-2 traitée à la bréfeldine A (10 µg/ml) pendant 18 heures (voir **Fig. 21.12**) exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL.

Le marqueur de la membrane plasmique FM4-64 est mis en contact des cellules traitées au moment de l'observation. Les structures vertes cytoplasmiques particulières provoquées par un traitement à la BFA (flèches bleues) ne sont pas des invaginations de la membrane plasmique.

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; MP, membrane plasmique ; ME, milieu extracellulaire ; V, vacuole)

Une autre possibilité serait que ces structures résultent d'un processus d'endocytose. Il a été montré récemment que ce processus existe dans les cellules végétales (pour revue, Low et Chandra, 1994 ; Battey *et al.*, 1999 ; Marcote *et al.*, 2000) et pourrait être stimulé par la BFA. On pourrait proposer que ces structures puissent correspondre soit à des « compartiments BFA » soit à des « compartiments hybrides RE-Golgi ».

4.4 Hypothèse d'une révélation de « compartiments BFA »

De part leur taille, leur dépendance à la BFA et leur forme plutôt arrondie les structures fluorescentes particulières que nous avons observées (**Fig. 21.13, page 160** et **21.16, page 163**, flèches roses) pourraient rappeler celle des « compartiments BFA ». Rappelons que dans nos conditions l'addition de la BFA aux cellules est faite trois heures avant l'addition de dexaméthasone, ce qui implique que des « compartiments BFA » pourraient être présents au moment de la biosynthèse des protéines GFP-DBCaM-CVIL ou GFP-DBCaM-CVIM (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Il est donc possible que les deux protéines isoprénylables puissent interagir avec les membranes de ce « compartiment BFA ».

Dans une revue parue en 2002, Andreas Nebenführ (Nebenführ, 2002 et références citées) a résumé les différents sites d'action probables de la BFA (croix rouges de la **Fig.** 21.10, page 157). En particulier, cette figure montre que le transport entre le « compartiment BFA » et la membrane plasmique est bloqué mais que le transport inverse peut se faire malgré

la présence de BFA ce qui expliquerait la présence de composés de la membrane plasmique (exemple : PIN 1 et 3, H⁺-ATPase) dans le « compartiment BFA ». Ainsi, les structures fluorescentes particulières observées dans les cellules TBY-2, en présence de BFA, pourraient résulter d'un phénomène d'endocytose, qui pourrait être stimulé par la BFA. Cette hypothèse expliquerait la diminution de fluorescence associée à la membrane plasmique et l'augmentation de celle qui est associée au cytoplasme.

4.5 Hypothèse d'une révélation de « compartiments hybrides RE-Golgi »

Comme montré dans les figures 21.11 (page 158) et 21.12 (page 159), les « compartiments hybrides RE-Golgi » sont déjà présents après une heure de traitement, donc avant la biosynthèse des protéines isoprénylables. D'après les travaux de Ritzenthaler et coll. (2002) réalisés avec les TBY-2, la morphologie de ce compartiment évolue au cours du temps, pour donner, après 5 heures de traitement par la BFA, une structure considérée par les auteurs comme « pathologique ». Les structures particulières fluorescentes révélées dans nos conditions (Fig. 21.16, page 163, flèches roses) ressemblent à ces formes pathologiques (Fig. 7(A), dans Ritzenthaler *et al.*, 2002) et pourraient donc correspondre à un marquage par la protéine GFP-DBCaM-CVIL du « compartiment hybride RE-Golgi ». On peut penser en effet, que les réactions de protéolyse et de carboxyl méthylation qui font immédiatement suite à l'isoprénylation et qui auraient lieu dans le RE, sont perturbées ou inhibées. Selon cette hypothèse les protéines GFP isoprénylées resteraient partiellement localisées dans ces structures hybrides d'où une diminution de l'intensité de fluorescence associée à la membrane plasmique.

En conclusion, nous avons montré que les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM sont transportées vers la membrane plasmique *via* une voie partiellement insensible à la BFA et qui ne ferait pas intervenir l'appareil de Golgi.

4.6 Observation des cellules en fin de cytocinèse

Dans les suspensions de cellules TBY-2 traitées à la BFA, nous avons observé la présence de cellules binucléées (**Fig. 21.14, page 161**). Dans le cas des lignées exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIM et GFP-DBCaM-CVIL deux types de cellules binucléées sont observés (**Fig. 21.14-c** et d): des cellules, présentant une plaque cellulaire avortée (PC), colorée en vert, et d'autres plus nombreuses, avec deux noyaux formés, sans plaque cellulaire apparente. Ces deux groupes de cellules ont été traités avec le FM4-64, un marqueur potentiel de la plaque cellulaire. Dans le premier cas, ce marqueur colocalise avec la plaque cellulaire avortée révélée par les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM (**Fig. 21.18-a** et **b**, **page 167**) et dans le second, aucune fluorescence verte ou rouge n'est observée entre les deux noyaux (**Fig. 21.18-a** et **b**).

Rappelons que la plaque cellulaire se forme à partir de vésicules issues de l'appareil de Golgi (Samuels *et al.*, 1995 ; Staehelin et Hepler, 1996) ; sa formation est donc sensible à la BFA. En effet, Yasuhara et Shibaoka (2000) ont montré que ce composé inhibe la formation de la plaque cellulaire, lorsque le traitement est réalisé avant que les cellules n'entrent en mitose ; ce traitement n'empêche pas, cependant, la mitose d'avoir lieu, ce qui explique la présence dans les cellules de deux noyaux. Cette situation correspond, dans notre cas, aux cellules binucléées où aucune plaque cellulaire n'a été révélée par le FM4-64 ou la fluorescence de la GFP (**Fig. 21.18**). On peut donc supposer que la BFA aurait agit avant le début de la mitose. Dans les cellules binucléées comportant une plaque cellulaire avortée, la BFA aurait agit plus tardivement ce qui aurait permis un début d'élaboration de la plaque cellulaire. L'arrêt de croissance de la plaque correspondrait à l'inhibition du flux des vésicules issues du Golgi par la BFA. Ce résultat est en accord avec les observations de Yasuhara et coll. (1995) selon lesquelles l'arrêt de croissance de la plaque cellulaire se produit, lorsque le traitement à la BFA est réalisé quand les cellules sont en métaphase.



Plaque cellulaire (PC) absente

Colocalisation des deux iluorescences (verte et rouge) au niveau de la plaque cellulaire (PC) portée

Fig. 21.18: Cellules de tabac en fin de cytocinèse-début de phase G1, exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL (a.) ou GFP-DBCaM-CVIM (b.), traitées à la bréfeldine A pendant 18 heures (10 µg/ml) (conditions de traitement: voir Fig. 21.12). Les cellules ont été mises en présence de FM4-64 (6.7 µg/ml) au moment de l'observation (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; PC, plaque cellulaire ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; ME, milieu extracellulaire ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; les points de repère sont en bleu ; les flèches rouges indiquent la membrane plasmique et la plaque cellulaire)

<u>5 µm</u> Fluorescence

5 un

La figure 21.19 montre le cas d'une cellule dans laquelle la plaque cellulaire a été inhibée vraisemblablement à un stade très précoce. En effet, au lieu d'une plaque cellulaire



Fig. 21.19: Cellule TBY-2 binuclée exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL et traitée à la bréfeldine A (10 μg/ml): mise en évidence de vésicules fortement fluorescentes localisées entre les deux noyaux (flèches **roses**) Les conditions de traitement sont schématisées dans la figure 2**1.12**

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en **rose** ; la flèche **bleue** représente la membrane plasmique (MP) ; N, noyau ; ME, milieu extracellulaire ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

organisée on observe plutôt un amas de vésicules fluorescentes entre les deux noyaux formés. Cette image laisse à penser qu'il s'agit de la première ou deuxième étape du processus de formation de la plaque cellulaire chez les plantes, un processus en cinq étapes (Samuels *et al.*, 1995 ; voir chapitre I). La croissance ultérieure de la plaque a été inhibée par la présence de la BFA. L'observation d'une fluorescence verte dans cet amas de vésicules atteste de la présence à ce stade précoce des protéines GFP isoprénylables. Cet « embryon » de plaque cellulaire semble constituer un site récepteur pour ces protéines. En l'absence totale de plaque cellulaire, aucun site récepteur potentiel n'étant présent, aucun marquage vert ne peut être observé.

En conclusion, nos résultats montrent que les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM peuvent s'associer à la plaque cellulaire malgré la présence de BFA, ce qui indique que ce ciblage ne nécessite pas une participation de l'appareil de Golgi. Le marquage observé à un stade très précoce de la formation de la plaque pourrait s'expliquer par le fait que les futurs composants de la membrane plasmique y sont déjà présents. Cette étude a été complétée par le traitement des quatre lignées transgéniques de tabac avec la cytochalasine D (**Fig. 21.20**).



Fig. 21.20: Hypothèse d'une intervention des filaments d'actine dans le transport vers la membrane plasmique des deux protéines isoprénylables, farnésylable (GFP-DBCaM-CVIM) et géranylgéranylable (GFP-DBCaM-CVIL) (PTase, isoprényl transférase)

5. Implication des filaments d'actine dans le trafic intracellulaire des protéines GFP d'intérêt ? Utilisation de la cytochalasine D

5.1 Conditions de traitement des transformants stables

Un traitement à la cytochalasine D (CYTD) provoque la dépolymérisation des filaments d'actine (Flanagan et Lin, 1980; Vaughan et Vaughn, 1987). Comme précédemment, les transformants stables (exprimant la GFP, la GFP-DBCaM-C/S, la GFP-DBCaM-CVIM ou la GFP-DBCaM-CVIL) ont été prétraités 3 heures à la cytochalasine D (20 μ M, Laporte *et al.*, 2003) avant l'induction de la biosynthèse des différentes protéines GFP par la dexaméthasone 10 μ M (**Fig. 21.21**).



cytochalasine D 20 µM. La dexaméthasone 10 µM sera ajoutée après 3 heures de présence de l'inhibiteur afin d'induire l'expression des protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S, GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL. Au bout de 18 heures de traitement, les cellules sont observées en microscopie confocale

(DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hPI, heures post-induction ; 0, temps zéro de l'expérience)

5.2 Localisation intracellulaire des protéines GFP d'intérêt dans les cellules TBY-2 traitées à la cytochalasine D

Comme montré par les figures 21.22 et 21.23 (page 172), la cytochalasine n'a pas d'effet sur la localisation intracellulaire des différentes protéines (GFP, GFP-DBCaM-C/S,



Fig. 21.22: Localisation des protéines GFP (**a**.) et GFP-DBCaM-C/S (**b**.) au cours du cycle cellulaire dans des cellules de tabac transgéniques traitées à la cytochalasine D 20 μ M (conditions de traitement voir **Fig. 21.21**) (Photos de microscopie confocale correspondant à la superposition des images obtenues en lumière blanche (contraste interférentiel de Nomarski) et en fluorescence (réalisées à l'objectif x63). N novau : V vacuole : ME milieu extérieur : les points de

(Photos de microscopie confocale correspondant à la superposition des images obtenues en lumière blanche (contraste interferentiel différentiel de Nomarski) et en fluorescence (réalisées à l'objectif x63) ; N, noyau ; V, vacuole ; ME, milieu extérieur ; les points de repère sont en rose)



Fig. 21.23: Distribution intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIM (**a**.) et GFP-DBCaM-CVIL (**b**.) au cours du cycle cellulaire dans des cellules de tabac transgéniques traitées à la cytochalasine D 20 μ M (conditions de traitement voir **Fig. 21.21**) (Photos de microscopie confocale correspondant à la superposition des images obtenues en lumière blanche (contraste interférentiel différentiel de Nomarski) et en fluorescence réalisées à l'objectif x63 ; les points de repère sont en **rose** ; MP, membrane plasmique ; PC, plaque cellulaire ; ME, milieu extracellulaire ; V, vacuole ; N, noyau)

GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM) à la fois dans les cellules en interphase et dans les TBY-2 en division, mitose et cytocinèse. En effet, la protéine GFP a une localisation cytosolique et nucléoplasmique, la GFP-DBCaM-C/S, une localisation nucléaire (**Fig. 21.22**, **page 171**). Les GFP isoprénylables, géranylgéranylable et farnésylable, ont une localisation majoritaire à la membrane plasmique (**Fig. 21.23**, **page 172**).

La dépolymérisation des filaments d'actine, induite par la cytochalasine D, n'a donc pas d'effet visible sur la localisation intracellulaire des protéines d'intérêt. Le transport des deux protéines GFP farnésylable ou géranylgéranylable, ainsi que le trafic de la protéine GFP-DBCaM-C/S, ne sont pas perturbés par la déstabilisation des filaments d'actine.

6. Conclusion

Les traitements déstabilisant les éléments du cytosquelette, microtubules ou filaments d'actine, ou la BFA interagissant avec l'appareil de Golgi, n'ont pas d'effets sur la localisation à la membrane plasmique ou à la plaque cellulaire des protéines GFP isoprénylables. De même, la localisation nucléaire de la protéine GFP-DBCaM-C/S n'est pas modifiée.

Pour compléter ces résultats, nous avons réalisé deux types d'expériences. Tout d'abord, les cellules ont été traitées à la fois par l'oryzaline et la cytochalasine D afin de déstabiliser les microtubules et les filaments d'actine (**Fig. 21.24, page 174**). Les cellules ont également été mises en présence des trois inhibiteurs : oryzaline, cytochalasine D et BFA, ceci afin de déstabiliser l'ensemble des éléments du cytosquelette et de perturber la voie sécrétoire qui met en jeu le Golgi (**Fig. 21.25, page 175**).

Dans la première série d'expériences, les cellules ont été traitées par l'oryzaline 3,3 μ M et par la cytochalasine D 20 μ M, pendant 3 ou 24 heures, avant induction de la biosynthèse des protéines fluorescentes étudiées (**Fig. 21.24-a**). Malgré la stabilisation du cytosquelette provoquée par ces deux drogues (temps de contact : 18 ou 39 heures) aucun effet de ce traitement sur la localisation intracellulaire des quatre protéines GFP, GFP-





Fig. 21.24: Transformants stables TBY-2 traités à l'oryzaline 3,3 μ M et à la cytochalasine D 20 μ M

Conditions de traitement (**a**., hPl, heures pré-induction ; hpl, heures post-induction ; ORY, oryzaline ; CYTD, cytochalasine D ; DEX, dexaméthasone) et distribution intracellulaire des protéines GFP (**b**.), GFP-DBCaM-C/S (**c**.), GFP-DBCaM-CVIM (**d**.) et GFP-DBCaM-CVIL (**e**.)

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; la barre blanche représente 10 µm ; les flèches roses indiquent la membrane plasmique (MP))

DBCaM-C/S, GFP-DBCaM-CVIM ou GFP-DBCaM-CVIL n'a été observé (**Fig.** 21.24-b à e). Après 39 heures de traitement, les cellules présentent une forme plus arrondie qui pourrait s'expliquer par la déstabilisation prolongée du cytosquelette, un effet déjà observé sous l'effet d'un traitement de 39 heures avec uniquement l'oryzaline (**Fig. 21.6**, page 149).

Dans la deuxième série d'expériences, les cellules ont été traitées pendant 18 heures par l'oryzaline 3,3 μ M, la cytochalasine D 20 μ M et la BFA 10 μ g/ml (**Fig. 21.25-a**). Dans les



Fig. 21.25: Traitement à l'oryzaline 3,3 μ M, à la cytochalasine D 20 μ M et à la bréfeldine A (10 μ g/ml) de cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL

a. Conditions de traitement (ORY, oryzaline ; CYTD, cytochalasine D ; BFA, bréfeldine A ; DEX, dexaméthasone ; hPI, Heures pré-induction ; 0, temps zéro de l'expérience ; hpI, heures post-induction)

b. Observations au microscope confocal de la localisation intracellulaire de la protéine géranylgéranylable sous l'effet du traitement

(Photos prises à l'objectif x63 ; les flèches **roses** représentent des structures cytoplasmiques particulières révélées par un traitement à la bréfeldine A seul ; les points de repère sont en **rose** ; les flèches **bleues** indiquent la membrane plasmique (MP) ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

transformants stables les différentes protéines fluorescentes présentent la même localisation que celle induite par un traitement par la BFA 10 μg/ml uniquement. Par exemple, dans le cas de cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, ce traitement révèle les structures particulières fluorescentes (flèches roses, **Fig. 21.25-b**) localisées dans le cytoplasme déjà observées (**¶4.3** ; flèches roses, **Fig. 21.13-d**, **page 160** et **Fig. 21.16**, **page 163**). Le traitement avec ces trois inhibiteurs n'empêche donc pas le ciblage des protéines isoprénylables à la membrane plasmique, qui constitue leur destination finale majoritaire.

Ces expériences confirment donc que, dans nos conditions expérimentales, ni le cytosquelette (microtubules et filaments d'actine), ni l'appareil de Golgi, ne participent au transfert des protéines farnésylables et géranylgéranylables vers la membrane plasmique. Au vu de ces résultats, la question du mode de trafic de ces protéines isoprénylables reste posée.

Partie 2

Origine des substrats isopréniques utilisés pour modifier une GFP isoprénylable

1. Introduction

Dans le chapitre I, nous avons mis au point un outil permettant de visualiser *in vivo* la réaction d'isoprénylation. Nous avons montré que les lignées transgéniques de tabac exprimant les protéines GFP-DBCaM-CVIL (géranylgéranylable) et GFP-DBCaM-CVIM (farnésylable) sont associées majoritairement à la membrane plasmique et que cette localisation est strictement dépendante de leur statut de prénylation. En effet, lorsque le résidu cystéine du motif CaaX est muté (remplacé par une sérine) les deux protéines isoprénylables s'accumulent au niveau du noyau. Quand la réaction de géranylgéranylation est inhibée par l'inhibiteur GGTI-2133, la localisation de la protéine GFP-DBCaM-CVIL est également modifiée. Rappelons qu'il existe chez les plantes supérieures deux voies distinctes de biosynthèse des isoprénoïdes, l'une localisée dans le cytoplasme (voie du MVA), l'autre dans le plaste (voie du MEP). Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant de déterminer l'origine métabolique des deux substrats isopréniques FPP et GGPP impliqués dans la réaction d'isoprénylation. En effet, chez les animaux et les levures, ces deux substrats sont synthétisés par la voie du MVA (Schafer et Rine, 1992 ; Sinensky et al., 1990). Chez les plantes, l'origine biosynthétique du GGPP utilisé pour la géranylgéranylation des protéines n'est pas bien définie. Il pourrait provenir soit du cytoplasme, soit du plaste, soit des deux compartiments à la fois. Il a été montré que le génome d'Arabidopsis contient plusieurs gènes codant une GGPP synthase (GGPS) (Okada et al., 2000). Deux GGPS ont été mises en évidence au niveau du réticulum endoplasmique, deux autres au niveau des plastes et une au niveau des mitochondries.

Pour déterminer l'origine métabolique du FPP et du GGPP, dans les cellules de TBY-2, nous avons utilisé, à la fois, des inhibiteurs spécifiques de chacune des deux voies (mévinoline (voie du MVA), fosmidomycine et kétoclomazone (voie du MEP)), et des intermédiaires biosynthétiques (MVA et formes alcool (géraniol, farnésol, géranylgéraniol) des composés phosphorylés correspondants : GPP, FPP, GGPP). L'utilisation des inhibiteurs permet d'appauvrir le contenu des cellules en isoprénoïdes dans chacun des compartiments. Rappelons que la mévinoline et la fosmidomycine inhibent respectivement l'HMGR (une enzyme limitante de la voie cytoplasmique) et la DXR, deux enzymes en amont de la formation du FPP et du GGPP. L'addition d'intermédiaires biosynthétiques exogène permet d'altérer les flux métaboliques et de complémenter l'inhibition spécifique de chacune des deux voies.

La figure 2**2.1** résume les principaux résultats concernant la localisation cellulaire des GFP isoprénylables. Dans le cas de la protéine géranylgéranylable, la différence de



Fig. 22.1 : Distinction de localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-C/S (a.), GFP-DBCaM-CVIL (b.), GFP-DBCaM-CVIM (c.). La distribution intracellulaire de la fluorescence issue de la protéine GFP-DBCaM-C/S est bien distincte de celle d'une GFP géranylgéranylable (a. et b.). Lorsque l'on compare la répartition de la fluorescence de ce même contrôle non isoprénylable avec celle de la GFP farnésylable (a. et c.), une telle distinction n'est pas aussi nette que dans le cas précédent. De ce fait, il est nécessaire de construire une nouvelle protéine de fusion GFP farnésylable dont la localisation cellulaire soit bien différente de celle d'un contrôle non isoprénylable.

localisation intracellulaire des protéines géranylgéranylées (majoritairement localisées à la membrane plasmique) (**Fig. 22.1-b**) et non géranylgéranylées (majoritairement nucléaires) est très nette (**Fig. 22.1-a**). Il n'en est pas de même pour la protéine farnésylable qui présente

toujours une localisation significative au niveau du noyau (**Fig. 22.1-c**). Nous avons donc essayé d'obtenir une nouvelle lignée cellulaire exprimant une protéine farnésylable dont la localisation soit d'avantage ciblée vers la membrane plasmique c'est-à-dire complètement absente du noyau. Il serait ainsi possible de mieux discriminer les deux états d'isoprénylation, farnésylé et non farnésylé. La protéine choisie a été la Rop6 d'*Arabidopsis thaliana*.

2. Construction d'une nouvelle GFP farnésylable à partir de AtRop6

Nous avons choisi une protéine Rop car ces protéines sont impliquées dans des voies de signalisation et sont localisées, dans la plupart des cas ; à la membrane plasmique où elles assurent leur(s) fonction(s).

2.1 Les protéines Rops, une sous-famille propre aux plantes

Le groupe des protéines Rops (nomenclature utilisée par : Li *et al.* 1998, 1999, 2001 ; Bischoff *et al.*, 2000 ; Molendijk *et al.*, 2001) appelées aussi RACs (nomenclature employée par : Winge *et al.*, 1997, 2000) appartient à la famille RHO. Les protéines Rops, qui sont spécifiques du règne végétal, forment l'unique classe des petites GTPases de plante, dont les membres constituent d'importants relais moléculaires dans les voies de signalisation cellulaire (pour revues : Yang, 2002 ; Gu *et al.*, 2004). Les protéines Rops présentent une grande diversité fonctionnelle (**Fig. 22.2, page 181**). Certaines, localisées à l'extrémité du tube pollinique, contrôlent sa croissance, en modulant à la fois la génération de gradients calciques et l'assemblage dynamique des filaments d'actine (Li *et al.*, 1999 ; Zheng et Yang, 2000 ; Fu *et al.*, 2001 ; **Fig. 22.2-2**). Elles régulent aussi divers aspects du développement des poils de racines (Molendijk *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2002). Elles interviennent dans la régulation de la production du second messager H₂O₂, souvent associé à la défense des plantes contre les



Fig. 22.2 : Schéma général illustrant la diversité fonctionnelle des protéines Rop/RAC GTPases (d'après Yang, 2002)
Les GAPs (GAP(s), « GTPase activating protein(s) »), protéine(s) inactivant les GTPases, stimulent la conversion de la forme Rop active, liée au GTP, en la forme Rop liée au GDP. (¹) Wu et coll. (2000) ont identifié une famille de GAPs spécifiques des Rops appelée RopGAPs (RopGAP(s), protéine(s) inactivant les GTPases Rops). Les GEFs (GEFs, « guanine nucleotide exchange factor(s) ») permettent l'activation des protéines Rops. La forme active de Rop liée au GTP interagit avec des effecteurs situés en aval régulant ainsi un changement local au niveau des membranes cellulaires comme par exemple, la formation d'un gradient calcique aux extrémités des tubes polliniques en croissance(²) (Li *et al.*, 1999). Les protéines Rop-GTP contrôlent la polarité et la morphogénèse cellulaire dépendantes de l'actine (³) (Fu *et al.*, 2002) et interviennent dans des processus de réponse de défense des plantes induite par des pathogènes (⁴) (Agrawal *et al.*, 2003). L'activation des Rops permet à la plante de mieux tolérer une privation en oxygène (⁵) (Baxter-Burrell *et al.*, 2002). Les Rops interviennent aussi dans des voies de transduction de signaux médiées par l'hormone ABA où elles agissent comme régulateurs négatif (⁶) (Zheng *et al.*, 2002).
(GTPase, « guanine nucleotide binding protein » ; Rop, « Rho-related GTPase from plants », GTPase de type Rho de plante ; Rop-GDP, forme

Rop liée à la guanosine diphosphate ; GDP, guanosine diphosphate ; Rop-GTP, forme active de Rop liée à la guanosine triphosphate ; GTP, guanosine triphosphate ; GDI(s), « guanine nucleotide dissociation inhibitor(s)» ; Ca^{2+} , ion calcium ; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène ; ABA , «abscisic acid », acide abscissique ; F-actine, filament d'actine)

pathogènes (Kawasaki *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2000, 2004 ; Baxter-Burrell *et al.*, 2002 ; **Fig.** 22.2, 4). Enfin, les protéines Rops sont impliquées dans la régulation négative des réponses à l'ABA (Cutler *et al.*, 1996 ; Pei *et al.*, 1998 ; Lemichez *et al.*, 2001 ; **Fig.** 22.2, 6).

Chez Arabidopsis, 11 GTPases Rops/RACs ont été identifiées (Winge et al., 2000). Ce

sont des protéines formées d'une extrémité N-terminales bien conservée et d'une extrémité C-terminale hypervariable (**Fig. 22.3**). Ce domaine hypervariable, riche en résidus basiques et

۵	b c	<u> </u>	
AtRop1	(AtRAC11)	MSASRFVKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CLLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVV	
AtRop2	(AtRAC4)	MASRFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CMLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVV	
AtRop3	(AtRAC1)	MSASRFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CLLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVV	
AtRop4	(AtRAC5)	MSASRFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CILISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVV	
AtRop5	(AtRAC6)(AtRac2)	MSASRFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CLLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVV	
AtRop6	(AtRAC3)(AtRac1)	MSASRFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CLLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVI	
AtRop7	(AtRAC2)	MSTARFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CMLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFSANVV	
AtRop8	(AtRAC9)	MSASMAATSTSSATATTFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CLLISYTSNT <mark>FPTDYVP</mark> TVFDNFNANVL	
AtRop9	(AtRAC7)	MSASKFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CMLICYTSNK <mark>FPTDYIP</mark> TVFDNFSANVA	
AtRop10	(AtRAC8)	MASSASKFIKCVTVGD <mark>GAVGKT</mark> CMLICYTSNK <mark>FPTDYIP</mark> TVFDNFSVNVV	
AtRop11	(AtRAC10)	MASSASKFIKCVTV <mark>GDGAVGKT</mark> CMLICYTSNK <mark>FPTDYIP</mark> TVFDNFSANVV	
		:: *:*********************************	
		п	
AtRop1	(AtRAC11)	VNGSTVNLGLW <mark>DTAG</mark> OEDYNRLRPLSYRGADVFILAFSLISKASYENVSKKWIPELKHYA	
- AtRop2	(AtRAC4)	VDGNTVNLGLW	
AtRop3	(AtRAC1)	VNGATVNLGLWDTAGOEDYNRLRPLSYRGADVFILAFSLISKASYENVSKKWIPELKHYA	
- AtRop4	(AtRAC5)	VDGNTVNLGLWOTAGOEDYNRLRPLSYRGADVFILAFSLISKASYEHVAKKWIPELRHYA	
- AtRop5	(AtRAC6)(AtRac2)	VNGATVNLGLWOTAGOEDYNRLRPLSYRGADVFILAFSLISKASYENVSKKWIPELKHYA	
AtRop6	(AtRAC3)(AtRac1)	VDGNTINLGLWDTAGOEDYNRLRPLSYRGADVFLLAFSLVSKASYENVSKKWVPELRHYA	
- AtRop7	(AtRAC2)	VDGSTVNLGLWOTAGOEDYNRLRPLSYRGADVFLLAFSLISKASYENIHKKWLPELKHYA	
AtRop8	(AtRAC9)	VDGKTVNLGLWDTAGQEDYNRVRPLSYRGADVFILAFSLISRPSFENIAKKWVPELRHYA	
- AtRop9	(AtRAC7)	VDGOIVNLGLW	
AtRop10	(AtRAC8)	VEGITVNLGLW <mark>DTAG</mark> QEDYNRLRPLSYRGADVFVLAFSLISRASYENVFKKWIPELQHFA	
AtRop11	(AtRAC10)	VEGTTVNLGLW <mark>DTAG</mark> QEDYNRLRPLSYRGADVFVLSFSLVSRASYENVFKKWIPELQHFA	
		: :**********************************	
AtRop1	(AtRAC11)	LII IV PGVPIVL <mark>VGTKL</mark> DLRDDKOFFIDHPGAVPITTAOGEELRKOIGAPTYI <mark>ECSS</mark> KTOENVKA	
AtRop1 AtRop2	(AtRAC11) (AtRAC4)	III IV PGVPIVL <mark>VGTKL</mark> DLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYI <mark>ECSS</mark> KTQENVKA PGVPIILV <mark>GTKL</mark> DLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGSAVYI <mark>ECSS</mark> KTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1)	III IV PGVPIVL <mark>VGTKL</mark> DLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKG	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPIYIECSSKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGSPIYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1)	PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSAKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGIPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGIPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFFKNYPGACTIFFEQGQELRKEIGALAYIECSSKAQMNVKA PTVPIVLVGTKSDLRDNMQFPKNYPGACTIFFEQGQELRKEIGALAYIECSSKAQMNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKSDLRDDKQFFKNYPGACTIFPEQGQELRKEIGALAYIECSSKAQMNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFFKNYPGACTIFPEQGQELRKEIGALAYIECSSKAQMNVKA PNVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC8)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKA PGIPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFFKNYPGACTIFPEQGQELRKEIGALAYIECSSKAQMNVKA PNVPIVLVGTKLDLRDDKQFLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC8) (AtRAC10)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGIPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELRKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGAASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGASTTFPEQGQELRKEIGALAYIECSSKTQQNVKA PNVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKIGAAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHPGLSPVTTSQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC8) (AtRAC10)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGIPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKEIGALAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDCKGYLADHTNVITSTQGEELRKIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDCKGYLADHPGLSPVTTSQGEELRKIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLRDCKGYLADHPGLSPVTTAQGEELRKIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLRDCKGYLADHPGLSPVTTAGGEELRKIGATYYIECSSKTQQNVKA	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop90 AtRop10 AtRop11	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC8) (AtRAC10)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PNVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKHIGAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKLIGAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLADHTNVITSTQGEELRKLIGAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQLADHTNVITSTQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKMDLREDRHYLSDHPGLSPVTTSQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA *::::***** ::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop11	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC11)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PVVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHPGLSPVTTSQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAGGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAGGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA YEDAAIRVVLQPFKQKKKKSKAQKACSII	1
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC11) (AtRAC11) (AtRAC4)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAAXYIECSSKTQQNVKA PVVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGALAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLSDHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA *:::::***** ***:::::::::::::::::::::::	1
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC11) (AtRAC1)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSPIYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGSPIYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASSITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA *::::********:::::::::::::::::**** Domaine C-terminal hypervariable VFDAAIRVVLQP KQKKKKSKAQKA STI	
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC5)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC11) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC5)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKLIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKUGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLRDCKYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA YFDAAIRVVLQP PKQKKKKSKAQKOSTI	Motif
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC11) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKUIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFIXDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKUGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPLVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA YFDAAIRVVLQP PKQKKKKSKAQKA STI 197 VFDAAIRVVLQP PKQKKKKSKAQKA STI 197 VFDAAIRVVLQP PKQKKKKKNKNRCVFI 196 VFDAAIRVVLQP PKQKKKKKNKNRCVFI 197	Motif CaaL
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC10) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1)	IIIIVPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKLIGAPTYIECSSKTQENVKAPGVPILLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKGPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASSITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPVVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKAPGVPLVLVGTKLDLREDRHYLSDHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKAPGVPLVLVGTKLDLREDCHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKAYFDAAIRVVLQPKQKKKKSKAQKA CSII197VFDAAIRVVLQPKQKKKKKNKNRCABI196VFDAAIRVVLQPKQKKKKKKAQKA CSII197VFDAAIRVVLQPKQKKKKK	Motif CaaL
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC4) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2)	IIIIVPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKLIGAPTYIECSSKTQENVKAPGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKGPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQENVKGPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKSQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASSITTAQGEELRKIGALAYIECSSKTQQNVKAPVVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKAPGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKAYFDAAIRVVLQP KQKKKKSKAQKA OSII	Motif CaaL
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop10 AtRop11 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC8) (AtRAC10) (AtRAC10) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9)	III IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PNVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGLSPVTTSQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGLSPVTTSQGEELRKHIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKYLSDHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA YFDAAIRVVLQP FKQKKKKS	Motif Caal.
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop10 AtRop11 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop7 AtRop8 AtRop8 AtRop9	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC10) (AtRAC1) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3) (AtRAC9) (AtRAC9) (AtRAC7)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKG PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQENVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTVQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASSITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGASTITFAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKQFLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKMDLREDRHYLSDHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKMDLREDRHYLSDHPGLSPVTTAGGEELRKLIGATYYIECSKTQQNVKA YFDAAIRVVLQP PKQKKKKSKAQKA © STI	Motif CaaL Motif
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC2) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC10) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC8)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSPIYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSPIYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHPGLSPVTTSQGEELRKLIGALAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLSDHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAGGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLANHPGLSPVTTAGGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVQP KQKKKKS	Motif CaaL Motif CaaX
AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop10 AtRop10 AtRop11 AtRop1 AtRop2 AtRop3 AtRop4 AtRop5 AtRop6 AtRop7 AtRop8 AtRop9 AtRop10 AtRop11	(AtRAC11) (AtRAC4) (AtRAC1) (AtRAC5) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC2) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC7) (AtRAC10) (AtRAC10) (AtRAC1) (AtRAC1) (AtRAC2) (AtRAC5) (AtRAC6)(AtRac2) (AtRAC3)(AtRac1) (AtRAC9) (AtRAC7) (AtRAC8) (AtRAC8) (AtRAC10)	HIL IV PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELRKQIGAPTYIECSSKTQENVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSAVYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTAQGEELKKLIGSPIYIECSSKTQQNVKA PGVPIILVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTNQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFIDHPGAVPITTQGEELKKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFFAEHPGAVPISTAQGEELRKLIGAPAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKQFLKDHPGASSITTAQGEELRKMIGAVRYLECSSKTQQNVKA PTVPIVLVGTKLDLRDDKQFLXDHPGASSITTAQGEELRKMIGAAYIECSSKTQQNVKA POVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHTNVITSTQGEELRKQIGAAYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLRDDKGYLADHPGLSPVTTSQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLADHPGLSPVTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVGTKLDLREDKHYLAMPGSSTTAQGEELRKLIGATYYIECSSKTQQNVKA PGVPIVLVQP KQKKKKSKAQKA CSII 197 VFDAAIRVVLQP KQKKKKSKAQKA CSII 197 VFDAAIRVVLQP KQKKKKK	Motif CaaL Motif CaaX

Fig. 22.3 : L'alignement des 11 séquences des protéines GTPases Rop/RAC d'*Arabidopsis* met en évidence une partie N-terminale hautement conservée et C-terminale hypervariable (réalisé grâce au programme ClustalW, Thompson *et al.*, 1994). Les protéines AtRop1 à AtRop8 possèdent un motif C-terminal de géranylgéranylation **CaaL** (C, cystéine ; L, leucine) alors que les protéines AtRop9 et AtRop10 ont un tétrapeptide putatif de farnésylation et AtRop11 n'a pas de motif CaaX. Ces trois dernières protéines possèdent des résidus cystéines (C) modifiables par palmitoylation dans le domaine hypervariable (Lavy *et al.*, 2002). Les étoiles (*) réfèrent à des résidus identiques (108 résidus), les points doubles (:) à des substitutions conservées et les points (.) à des substitutions semi-conservées entre les différentes séquences alignées (39+11=50 résidus). Selon cet alignement, ces 11 séquences ont 53 ,5 % de résidus identiques et 24,6 % d'aminoacides similaires ; les résidus basiques composant le domaine hypervariable sont figurés en **rose** (**R**, arginine ; **H**, histidine ; **K**, lysine), les aminoacides apolaires sont en violet (V, valine ; **I**, isoleucine ; **A**, alanine ; **G**, glycine ; **P**, proline ; **C**, cystéine ; **L**, leucine). En **orange** sont figurés les quatre domaines (**I** à **IV**) de fixation du guanine nucléotide importants pour l'activité GTPase et conservés chez les petites protéines lian le GTP ; le domaine effecteur (**E**) des GTPase est figuré n **rouge**. (AtRop1, Numéro d'accès : AAC78240; AtRop5, Numéro d'accès : AAF40245 et Q9SBJ6 ; AtRop6, Numéro d'accès : AAC78241 ; AtRop7, Numéro d'accès : Q9XGU0 ; AtRop9, Numéro d'accès : O82480 ; AtRop10, Numéro d'accès : Q9SU67 ; AtRop11, Numéro d'accès : O82481)

At, Arabidopsis thaliana

a, nomenclature utilisée par Li et coll. (1998, 1999, 2001), Bischoff et coll. (2000) et Molendijk et coll. (2001)

c, nomenclature trouvée dans Kost et coll. (1999) et Lemichez et coll. (2001)

non polaires, se termine, pour 10 d'entre elles, par un motif potentiel d'isoprénylation. Parmi ces protéines, 8 ont un motif de géranylgéranylation CaaL (AtRop1 à AtRop8) et 2 sont farnésylables (AtRop9 et AtRop10). AtRop9, AtRop10 et AtRop11, possèdent des cystéines C-terminales modifiables par palmitoylation, situées dans le domaine hypervariable. La localisation à la membrane plasmique de ces trois protéines est indépendante de leur état de prénylation mais nécessite leur palmitoylation (Lavy *et al.*, 2002 ; **Fig. 22.3**). Ces trois protéines ne sont donc pas de bons candidats pour créer une nouvelle GFP farnésylable. Parmi les autres protéines de ce groupe, toutes potentiellement géranylgéranylables, il a été montré que AtRop6 se localise spécifiquement à la membrane plasmique chez TBY-2 (Bischoff *et al.*, 2000). C'est la raison pour laquelle, nous avons choisi cette protéine pour construire notre nouvel outil.

Nous avons suivi la même démarche de travail que précédemment (Chapitre I). Dans un premier temps, il a été nécessaire de déterminer quelle est la séquence minimale de AtRop6 à fusionner à la GFP, afin de s'affranchir de sa fonction cellulaire. Le(s) différentes protéine(s) de fusion GFP créées dans ce but ont été exprimées de façon transitoire ou stable dans les cellules TBY-2.

2.2 Choix de la partie C-terminale à fusionner à la GFP

Il a été montré que la région C-terminale de AtRop6 influence sa localisation intracellulaire (Bischoff *et al.*, 2000). Une autre protéine Rop, AtRop4, qui présente comme AtRop6, un site de géranylgéranylation, a une localisation cytoplasmique périnucléaire. Quand on remplace les 48 derniers aminoacides de AtRop6 par les 46 derniers résidus de AtRop4, la localisation cellulaire de AtRop6 devient similaire à celle de AtRop4 (Bischoff *et al.*, 2000). Comme le montre la figure 22.3, le domaine C-terminal hypervariable de la AtRop6 est constitué de 64,3% de résidus chargés positivement (« domaine basique ») avant le tétrapeptide CSIL (Fig. 22.4-a., page 184).

Afin de déterminer la séquence minimale nécessaire et suffisante à la localisation exclusive de AtRop6 à la membrane plasmique, différentes protéines de fusions GFP,

b, nomenclature employée par <u>Winge et coll. (1997, 2000</u>)
possédant les 12, 20, 26 ou 32 derniers résidus du domaine hypervariable de cette GTPase ont été réalisées. Leur localisation a été observée, après expression transitoire dans les cellules TBY-2.





Fig. 22.4 : La protéine AtRop6 possède un domaine N-terminal conservé et un domaine C-terminal appelé domaine hypervariable se finissant par un motif de géranylgéranylation

a. Représentation schématique des différents domaines composant la protéine AtRop6: la partie N-terminale neutre est formée de 4 domaines (**I** à **IV**) intervenant dans la fixation du guanine nucléotide et dans l'activité GTPase, ainsi que d'un domaine effecteur (**E**). Elle est suivie d'une région C-terminale basique (composée de 64,3% de résidus chargés positivement) et d'une séquence de type CsiL; sont représentés les pourcentages (%) en résidus acides (-), basiques (+) ou neutres (0) de chaque partie.

b. Représentation graphique du profil d'hydrophobicité de AtRop6: un pic « d'hydrophilicité » majeur est observé au niveau du domaine hypervariable de cette protéine. Ce profil a été réalisé avec ProtScale (<u>http://www.expasy.org/tools/protscale.html</u>; Gasteiger *et al.*, 2005) selon la méthode d'analyse établie par Kyte et Doolittle (1982).

Ь.

2.3 Isolement de AtRop6, construction de protéines de fusion GFP et expression transitoire dans les cellules TBY-2

La séquence de la protéine entière AtRop6-CSIL (198 acides aminés) a été amplifiée par PCR à partir d'une banque d'ADNc d'*Arabidopsis*, construite au laboratoire par Andréa Hemmerlin et Eléonore Guilley, grâce à des oligonucléotides situés aux deux extrémités de la séquence génétique de AtRop6 (AtRopF et AtRop6R, séquence en Annexe 3). *AtRop6* a été ainsi isolé et cloné dans le vecteur pGEM[®]-T, est utilisé comme séquence matrice afin d'amplifier, par réaction de PCR, les séquences génétiques codant pour les 12, 20, 26 ou 32 derniers aminoacides. Ces séquences ont été fusionnées en C-terminal de la GFP dans le vecteur pGFP-MRC (**Fig. 22.5**) et les protéines de fusions créées ont été nommées GFP- Δ 12



Fig. 22.5: Création de protéines de fusion entre la GFP et différentes parties du domaine C-terminal de AtRop6 **a**. La partie C-terminale de AtRop6 présentée (42 derniers résidus) comporte deux régions hydrophiles (résidus bleus) dont l'une, fortement hydrophile, est située dans le domaine hypervariable. Elle comporte aussi une région hydrophobe (en rouge). Le motif de géranylgéranylation CSIL a des propriétés plutôt hydrophobes. Pour chaque acide aminé, un gradient spécifique de nuances a été choisi dans le bleu (résidus hydrophiles) et le rouge (aminoacides hydrophobes) ; les aminoacides en noir forment une frontière entre deux régions (cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel SeqView v. 1.0.1). La distribution des charges positives (+) et négatives (-) dans la séquence C-terminale de AtRop6 est aussi représentée ; les aminoacides non chargés sont symbolisés par «0».

b. Fusions réalisées entre les séquences génétiques des 12, 20, 26 ou 32 derniers acides aminés C-terminaux de la protéine AtRop6 et la séquence de la protéine GFP. Les acides aminés basiques sont en **rose** (**R**, arginine ; **K**, lysine). La protéine de fusion GFP- Δ 32Rop6-CSIL comporte les deux régions hydrophobe et hydrophile C-terminales de AtRop6, alors que la protéine GFP- Δ 20Rop6-CSIL n'est formée que du domaine fortement hydrophile de la GTPase.

c. Un contrôle non isoprénylable a été créé et est nommé GFP-Δ32Rop6-SSIL ; il a été obtenu par mutation ponctuelle de la cystéine du motif CSIL de la protéine GFP-Δ32Rop6-CSIL en sérine

Rop6-CSIL, GFP- $\Delta 20$ Rop6-CSIL, GFP- $\Delta 26$ Rop6-CSIL et GFP- $\Delta 32$ Rop6-CSIL (**Fig. 22.5-b** et **Fig.** MM.17). La séquence de la protéine GFP- $\Delta 32$ Rop6-CSIL comporte une partie hydrophile qui correspond au domaine hypervariable. La protéine GFP- $\Delta 20$ Rop6-CSIL est composée uniquement par le domaine hypervariable hydrophile de AtRop6 (**Fig. 22.5-a** et b). Un contrôle non isoprénylable, a été obtenu par mutation de la cystéine du motif CSIL, de la protéine GFP- $\Delta 32$ Rop6-CSIL, en sérine, pour donner la protéine GFP- $\Delta 32$ Rop6-SSIL (**Fig. 22.5-c**).

Ces quatre protéines de fusion GFP, ainsi que la protéine contrôle ont été exprimées transitoirement après bombardement dans les cellules TBY-2. Les résultats sont présentés dans la figure 22.6 (page 187) La protéine GFP-Δ12Rop6-CSIL se localise dans les cellules TBY-2 comme la protéine GFP non fusionnée, c'est-à-dire dans le nucléoplasme et le cytosol. Les 12 aminoacides C-terminaux de AtRop6 n'influencent donc pas la localisation cellulaire de la GFP. Aucune fluorescence membranaire n'est observable, ce qui laisse penser que cette protéine n'est peut être pas isoprénylée (Fig. 22.6-a et c). Les trois autres protéines GFP- $\Delta 20$ Rop6-CSIL, GFP- $\Delta 26$ Rop6-CSIL et GFP- $\Delta 32$ Rop6-CSIL sont localisées à la fois dans le noyau, le cytoplasme, mais aussi dans la membrane plasmique (Fig. 22.6-b) ce qui indique que les 20 derniers résidus C-terminaux de AtRop6 sont nécessaires pour obtenir une localisation à la membrane plasmique de la protéine de fusion. Cependant, les 32 aminoacides C-terminaux de AtRop6 ne sont pas suffisants pour permettre une localisation exclusive à la membrane plasmique comme la protéine entière (Bischoff et al., 2000). Les trois protéines (GFP-Δ20Rop6-CSIL, GFP-Δ26Rop6-CSIL et GFP-Δ32Rop6-CSIL) présentent toutes la même distribution intracellulaire qui est similaire à celle d'une GFP-AtRop6 dont la thréonine en position 20 a été mutée en arginine (Bischoff et al., 2000). Il a été montré que cette mutation empêche la conversion du GDP en GTP et donc inactive la protéine (John et al., 1993). La séquence des trois protéines de fusion utilisées est effectivement dépourvue du site correspondant à l'activité GTPase. Lorsque le résidu guanine en position 64 de la protéine AtRop6 mutante est remplacé par une leucine, la protéine se localise de nouveau à la membrane plasmique comme AtRop6 sauvage (Bischoff et al., 2000). Il semblerait donc que la localisation exclusive à la membrane plasmique de AtRop6 soit dépendante de la séquence protéique complète comprenant, en particulier, les sites nécessaires à la fonction GTPase.



Fig. 22.6: Expression transitoire des protéines de fusion GFP- Δ 12Rop6-CSIL, GFP- Δ 20Rop6-CSIL, GFP- Δ 26Rop6-CSIL, GFP- Δ 32Rop6-CSIL dans des cellules de tabac BY-2

a. La protéine GFP- Δ 12Rop6-CSIL a une localisation nucléaire et cytosolique et ne se localise pas à la membrane plasmique de la cellule

b. Les protéines GFP- $\Delta 20$ Rop6-CSIL, GFP- $\Delta 26$ Rop6-CSIL et GFP- $\Delta 32$ Rop6-CSIL ont une localisation intracellulaire similaire: la fluorescence verte est nucléaire, cytoplasmique et membranaire.

c. La protéine contrôle GFP- Δ 32Rop6-SSIL se situe dans le noyau et le cytosol cellulaire

Les observations ont été réalisées en microscopie confocale (objectif x63) ; la barre blanche représente $10\,\mu m$

2.4 Construction de la protéine de fusion GFP-AtRop6 et expression transitoire dans les cellules TBY-2

L'ensemble de la séquence génétique de la protéine AtRop6, clonée dans le vecteur pGEM[®]-T et amplifiée par réaction de PCR, a été sous-cloné dans pGFP-MRC, en C-terminal de la séquence de la GFP pour donner pGFP-AtRop6-CSIL (Fig. MM.17). Les cellules TBY-2 ont été transformées par bombardement avec cette construction. Les transformants qui expriment la protéine de fusion GFP-AtRop6-CSIL présentent une fluorescence verte localisée uniquement à la périphérie de la cellule (Fig. 22.7-a, page 189). Ce résultat est tout à fait similaire à celui obtenu par Bischoff et al. (2000) et correspond au but que nous voulions atteindre. Afin de construire une protéine de fusion GFP farnésylable, la leucine du motif CSIL de AtRop6 a été mutée en méthionine, par réaction de PCR avec des oligonucléotides appropriés (Annexe 3). La construction pGFP-AtRop6-CSIM a été introduite dans les cellules TBY-2 par bombardement. Dans les transformants, la protéine GFP-AtRop6-CSIM (farnésylable), présente une distribution intracellulaire identique à celle de la protéine GFP-AtRop6-CSIL (géranylgéranylable) (Fig. 22.7-a et -b). Quand la cystéine du motif CSIL est mutée en sérine, la protéine GFP-AtRop6-C/S (non isoprénylable) est localisée dans le cytosol et le noyau cellulaire (Fig. 22.7-c). Nous avons donc obtenu un nouvel outil approprié à l'étude de la réaction de farnésylation, puisque la localisation intracellulaire de la protéine GFP-AtRop6-CSIM est le reflet de son état de prénylation.

Les séquences génétiques codant les protéines de fusion GFP-AtRop6-CSIM et GFP-AtRop6-C/S, ont été clonées dans le vecteur pTA7001 (Aoyama et Chua, 1997) (**Fig.** MM.18). L'agroinfection des cellules TBY-2 avec les deux nouveaux vecteurs pTA-GFP-AtRop6-CSIM et pTA-GFP-AtRop6-C/S, a permis de créer un système d'expression stable.





2.5 Expression stable des protéines GFP-AtRop6-CSIM et GFP-AtRop6-C/S dans les cellules TBY-2

La biosynthèse des protéines GFP-AtRop6-CSIM et GFP-AtRop6-C/S a été induite par la dexaméthasone 10 µM dans les conditions établies précédemment (Chapitre I). Les transformants stables ont été observés après 15 heures de culture, en microscopie confocale.

La figure 22.8-a montre que la protéine GFP-AtRop6-CSIM (farnésylable) est localisée essentiellement à la membrane plasmique (74 %) ; 19 % de la fluorescence sont



Fig. 22.8: Observation en microscopie confocale (objectif x63) de la localisation des protéines de fusion GFP-AtRop6-CSIM (a.) et GFP-AtRop6-C/S (b.) exprimées durant 15 heures sous l'effet de la dexaméthasone 10 μ M dans des cellules de tabac BY-2

présents dans le cytoplasme et 7 % dans le noyau (**Fig. 22.10-a**). Dans ces conditions expérimentales, les mitochondries peuvent être visualisées en rouge grâce au MitoTracker[®], ce qui atteste du bon état physiologique des cellules (**Fig. 22.9**). La protéine GFP-AtRop6-C/S



Fig. 22.9: Les cellules TBY-2 sont viables lorsque la protéine GFP-AtRop6-CSIM est exprimée pendant 15 heures sous l'effet de la dexaméthasone 10 μ M, comme révélé par le marquage rouge des mitochondries par le MitoTracker[®]. Dans ces conditions d'expression, la protéine de fusion, qui se localise pour une grande partie à la membrane plasmique, ne semble pas provoquer de plasmolyse cellulaire. Les images ont été prises au microscope confocal (objectif x63).

(Les points de repère sont en bleu ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

présente une localisation distincte de celle de la protéine farnésylable (**Fig. 22.10**). Cette protéine non farnésylable s'accumule majoritairement dans le noyau (66 %) et dans le cytosol (33 %) de la cellule (**Figures 22.8-b, page 190** et 2**2.10-b**).

a. GFP-AtRop6-CSIM



Résultat de l'analyse de 2 cellules



Fig. 22.10: Répartition de l'intensité de fluorescence dans des cellules TBY-2 exprimant stablement soit la protéine GFP-AtRop6-CSIM (**a**.) soit la protéine GFP-AtRop6-C/S (**b**.)

Les lignées sont repiquées (proportions 1:4) avant l'ajout de dexaméthasone 10 µM dans le milieu de culture induisant l'expression des protéines fluorescentes d'intérêt. Les cellules sont observées sur lame au microscope confocal au bout de 15 heures d'induction. Après numérisation, la répartition de l'intensité de fluorescence dans chaque cellule (V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme) est calculée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., http://rsb.info.nih.gov/ij/) (voir matériel et méthodes).

La distribution intracellulaire des deux protéines GFP-AtRop6-CSIM et GFP-AtRop6-C/S n'est pas modifiée 40 heures après l'addition de dexaméthasone (**Fig. 22.11**). Par contre,



Fig. 22.11 : Localisation intracellulaire des protéines GFP-AtRop6-CSIM et GFP-AtRop6-C/S au cours du temps. Les transformants sont mis en présence de dexaméthasone 10 μ M (DEX 10 μ M) et les cellules BY-2 sont observées au microscope confocal (objectif x63) au bout de 15 heures (15 hpI) et 40 heures (40 hpI) post-induction

au moment de la cytocinèse attestée par la présence de deux noyaux, la protéine GFP-AtRop6-CSIM marque la nouvelle membrane séparant les deux cellules filles (**Fig. 22.12-a**, **page 194**). Cette membrane pourrait correspondre à la plaque cellulaire qui se forme en fin de mitose. La protéine contrôle GFP-AtRop6-C/S reste cytosolique et nucléaire tout au long du cycle cellulaire.

a. GFP-AtRop6-CSIM







Fig. 22.12 : Distribution intracellulaire de la fluorescence verte issue des protéines GFP-AtRop6-CSIM (**a**.-**b**.) et GFP-AtRop6-C/S (**c**.): la protéine GFP-AtRop6-CSIM, dont la localisation reste membranaire au moment de la mitose (**a**., cellule certainement en métaphase, car présence de structures révélées en DIC pouvant correspondre à des chromosomes alignés (flèches blanches)), semble se localiser au niveau de la plaque cellulaire (**a**, flèches **roses**; **b**.) des cellules TBY-2 au moment de la cytocinèse, contrairement à la protéine GFP-AtRop6-C/S observée à ce stade de division (**c**.).

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; PC, plaque cellulaire ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; les points de repère sont en rose ; concentration en FM4-64 employée: $6.7 \mu g/ml$)

2.6 Expériences de colocalisation de la protéine GFP-AtRop6-CSIM avec le FM[®]4-64

Afin de vérifier la localisation à la membrane plasmique de la protéine GFP-AtRop6-CSIM dans les cellules de tabac, nous avons utilisé le FM[®]4-64. L'expression de la protéine a été induite dans les conditions habituelles. Les cellules ont été mises en présence du marqueur rouge (6.7 μ g/ml) et observées dans les 5 minutes suivantes. La présence d'une fluorescence jaune au niveau de la membrane plasmique indique une colocalisation de la protéine GFP farnésylable et du FM4-64 (**Fig. 22.13-a**). Dans le cas de la protéine non isoprénylable GFP-AtRop6-C/S, aucune colocalisation avec le FM4-64 n'est observée (**Fig. 22.13-b**).



Fig. 22.13: Colocalisation de la fluorescence verte de la protéine GFP-AtRop6-CSIM avec le marqueur rouge FM4-64 au niveau de la membrane plasmique d'une cellule de tabac BY-2. L'expression des protéines GFP-AtRop6-CSIM (**a**.) et GFP-AtRop6-C/S (**b**.) est induite à la dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures. Les cellules sont ensuite mises en présence de FM4-64 (6.7 μ g/ml) et observées dans les 5 minutes qui suivent.

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; V, vacuole ; ME, milieu extérieur à la cellule ; les points de repère sont en rose ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

Un traitement des transformants avec le mannitol (0,23 M) entraîne une rétractation de la membrane plasmique des cellules (**Fig. 22.14**). Cette plasmolyse est déjà visible après 5

minutes. Dans ces conditions, les deux marqueurs, FM[®]4-64 et GFP-AtRop6-CSIM, restent colocalisés (Fig. 22.14-a).



Ь.



Fig. 22.14: Plasmolyse des cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-AtRop6-CSIM (**a**.) ou le contrôle non isoprénylable GFP-AtRop6-C/S (**b**.) en présence de FM4-64. Les transformants sont traités à la dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures. Au moment de l'observation, ces cellules sont mises en présence de FM4-64 (6.7 μ g/ml) et de mannitol 0,45 M (1:1, v/v). Elles sont numérisées dans les 30 minutes qui suivent.

(Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; V, vacuole ; ME, milieu extérieur à la cellule ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski ; les points de repère sont en bleu)

L'ensemble de ces observations confirme que la protéine GFP farnésylable GFP-AtRop6-CSIM se localise bien à la membrane plasmique des cellules TBY-2.

2.7 Conclusion

Une deuxième protéine de fusion GFP farnésylable, GFP-AtRop6-CSIM a été construite. Celle-ci possède les caractéristiques de localisation intracellulaire nécessaires aux études métaboliques que nous souhaitons réaliser. En effet, GFP-AtRop6-CSIM (farnésylable) se localise majoritairement (74 %) à la membrane plasmique alors que la protéine non farnésylable présente une répartition cellulaire nucléaire et cytosolique, bien distincte de celle de la protéine d'intérêt.

3. Etudes métaboliques : traitement des transformants stables par différents inhibiteurs des voies de biosynthèse

3.1 Introduction

Dans cette partie, l'expression des protéines d'intérêt GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-AtRop6-CSIM ainsi que celle des protéines contrôles GFP, GFP-DBCaM-C/S et GFP-AtRop6-C/S a été induite dans les conditions standard mises au point dans la première partie de ce travail. Dans un but de reproductibilité et de comparaison de résultats, l'induction de leur biosynthèse a donc toujours été provoquée par l'addition de dexaméthasone 10 µM et l'observation des cellules au microscope confocal réalisée après 15 heures.

3.2 La mévinoline

La mévinoline (MV) ou lovastatine, composé isolé chez l'ascomycète Aspergillus terreus (Alberts et al., 1980), fait partie de la famille des statines.

a. Propriétés pharmacologiques des statines

Les molécules composant ce groupe ont des propriétés pharmacologiques importantes et son utilisées, en particulier, dans le traitement de l'hypercholestérolémie, un facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Klag *et al.*, 1993). Les statines permettent toutes de diminuer le niveau de cholestérol plasmatique, mais diffèrent de part leur structure chimique (**Fig. 22.15-a, page 199**), leur profil pharmacocinétique et l'efficacité des modifications lipidiques qu'elles induisent (pour revue, Schachter, 2005). La mévinoline (**Fig. 22.15-c**), par exemple, permet une baisse moyenne de 17 % du cholestérol total, alors que la simvastatine (**Fig. 22.15-a**), la plus prescrite actuellement, provoque une réduction moyenne de 25 % du cholestérol total (Edwards et Moore, 2003). La mévinoline peut être utilisée en combinaison avec la niacine-ER («niacin-extended-release ») contre la « dyslipidémie » (Moon et Kashyap, 2002 ; Yim et Chong, 2003 ; Bays, 2004).

Les statines ont d'autres effets non reliés à la présence du cholestérol. Elles permettent, entre autre, une amélioration ou une restauration de la fonction endothéliale (Liao, 2002), permettent de prévenir l'hypertrophie cardiaque (Nakagami *et al.*, 2003). Elles stimulent la formation des os (Mundy *et al.*, 1999), ont des propriétés anti-inflammatoires et des effets anti-oxydants (pour revue, Davignon et Laaksonen,1999). Du fait de leurs propriétés anti-prolifératives, pro-apoptotiques et anti-invasives, les statines sont aussi utilisées en tant qu'agents anti-cancéreux (pour revue, Chan *et al.*, 2003). La mévinoline, par exemple, qui a un effet apoptotique sur les cellules de carcinomes de la tête ou du cou (Knox *et al.*, 2005), inhibe aussi la prolifération des cellules leucémiques (Lewis *et al.*, 2005). Ces effets peuvent être mis en relation avec l'isoprénylation des protéines.

Chez les mammifères, les statines permettent de perturber la prénylation des protéines. En diminuant la concentration en MVA, elles induisent un appauvrissement cellulaire en FPP et GGPP. Ceci compromet le processus de modification post-traductionnelle qui résulte en l'accumulation de protéines non isoprénylées, en particulier des protéines Ras et des protéines « Ras-related » (Schafer *et al.*, 1989 ; Sinensky *et al.*, 1990 ; Leonard *et al.*, 1990 ; Hohl et Lewis, 1995). L'inhibition de l'isoprénylation de certaines protéines peut induire l'apoptose de certains types cellulaires comme les cellules endothéliales humaines (Li *et al.*, 2002). On comprend donc mieux l'intérêt d'utiliser les statines comme agent anti-cancéreux. Il a été



Fig. 22.15: Structure de certaines statines dont la mévinoline et de l'HMG-CoA

a. Structure de certaines statines: elle diffère principalement au niveau des positions R1 et R2 indiquées sur la formule générale
b. Conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) en acide mévalonique (MVA) par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme-A-réductase (HMGR) et structure de l'intermédiaire réactionnel (3S,5R)-mévaldyl-CoA thiohémiacétal
c. Structure de la mévinoline: elle est en équilibre entre la forme acide et la forme lactone et est fonction du pH de la solution. L'acide mévinolinique, forme acide ouverte, est actif catalytiquement *in vivo* et stable dans des solutions dont le pH est basique.

montré, par exemple, que l'inhibition de la géranylgéranylation des protéines par la mévinoline, induit l'apoptose des cellules cancéreuses de la thyroïde (Zhong *et al.*, 2003).

b. Les statines sont des inhibiteurs de l'HMGR

L'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase (HMGR) catalyse la réaction de conversion irréversible du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate (MVA) (**Fig. 22.15-b**). Cette réaction est considérée comme une étape régulatrice clé du métabolisme des isoprénoïdes chez les mammifères (Goldstein et Brown, 1990). L'inhibition de cette enzyme entraîne un appauvrissement en isoprénoïdes cellulaires importants, comme le cholestérol et les substrats des réactions d'isoprénylation, FPP et GGPP. Ayant une structure similaire à celle de l'état de transition de la réaction catalysée par l'HMGR, le (3S, 5R) mévaldyl-CoA thiohémiacétal (**Fig. 22.15-b**), les statines sont des inhibiteurs très puissants de cette enzyme (Ki de 0,1 à 2,3 nM, Corsini *et al.*, 1995).

Le statines, comme la mévinoline (MV) (**Fig. 22.15-c**), inhibent aussi l'activité de l'HMGR végétale comme celle de radis (Bach et Lichtenthaler, 1982, 1983b) ou de tabac (Vogeli et Chappell, 1991 ; Hemmerlin, 1997 ; Hemmerlin et Bach, 1998). Les effets de ce composé sur les cellules de tabac BY-2 ont été bien caractérisés (Hemmerlin, 1997).

c. Conditions de traitement des cellules TBY-2 avec la mévinoline

La mévinoline (MV) est un composé relativement lipophile, contrairement à d'autres statines, ce qui lui permet de traverser les membranes cellulaires efficacement. Elle inhibe la prolifération des cellules TBY-2 (Randall *et al.*, 1993 ; Crowell et Salaz, 1992 ; Morehead *et al.*, 1995). La division cellulaire est bloquée à près de 90 % par un traitement avec 5 μ M de MV (Hemmerlin, 1997 ; Hemmerlin et Bach, 1998). Comme pour certaines lignées cellulaires animales, elle présente une certaine toxicité pour les TBY-2 (Hemmerlin et Bach, 1998). Nous avons donc utilisé initialement une concentration en MV de 5 μ M, avec un temps de contact des cellules avec ce composé ne dépassant pas 18 heures.

Les cellules ont été traitées avec la MV, 3 heures avant l'induction par la dexaméthasone 10 μ M de la biosynthèse des différentes protéines GFPs d'intérêt, isoprénylables ou non (**Fig. 22.16-a**). Ce prétraitement a pour but de bloquer en amont la voie



Fig. 22.16: Effet de la mévinoline (MV) 5 ou 10 μ M sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL: conditions de traitement (a. ; DEX, dexaméthasone; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation majoritaire à la membrane plasmique (MP) ou à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) (b.) ; ces pourcentages sont obtenus par comptage au microscope à fluorescence des cellules traitées à la MV 5 ou 10 μ M ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 160 cellules ont été observées en moyenne pour chacun des trois échantillons (non traité, MV 5 μ M ou MV 10 μ M). La répartition de la fluorescence intracellulaire des cellules traitées à la MV 5 ou 10 μ M (c.) est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., http://rsb.info.nih.gov/ij/) (voir matériel et méthodes) (ME, milieu de culture extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme).

du MVA afin d'appauvrir la cellule en isoprénoïdes synthétisés en aval de l'HMGR. Les effets sur la localisation intracellulaire des différentes protéines GFPs sont observés en

microscopie confocale 15 heures après l'addition de dexaméthasone (18 heures de contact avec la MV).

d. Effets de la MV sur la localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-C/S, GFP-AtRop6-C/S et GFP

La mévinoline (MV) n'a pas d'effet visible sur la localisation intracellulaire des trois protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S et GFP-AtRop6-C/S. En effet, la fluorescence reste localisée dans le cytosol et le nucléoplasme, pour la GFP, dans le noyau, pour la GFP-DBCaM-C/S et à la fois dans le noyau et le cytosol pour la protéine GFP-AtRop6-C/S.

Nous avons aussi testé les effets d'un traitement MV 5 μ M sur la distribution intracellulaire d'un dérivé fluorescent de farnésol dans des cellules TBY-2 sauvages. L'isoprénol a été ajouté après 18 heures de contact des cellules avec la MV 5 μ M. Les cellules sont alors immédiatement observées en microscopie confocale. Les résultats indiquent que la localisation du farnésol fluorescent n'est pas affectée et reste membranaire.

e. Effets de la MV sur la distribution intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIM, GFP-AtRop6-CSIM et GFP-DBCaM-CVIL

La double localisation nucléaire et membranaire de la protéine farnésylable GFP-DBCaM-CVIM ainsi que la localisation majoritairement membranaire de la protéine farnésylable GFP-AtRop6-CSIM ne sont pas affectées par le traitement à la MV. Les deux protéines farnésylables se comportent donc de la même façon vis-à-vis de l'inhibiteur.

Dans les cellules traitées à la MV 5 ou 10 μ M, exprimant la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL, la majorité de la fluorescence est associée à la membrane plasmique (90 % en moyenne) (**Fig. 22.16-c, page 201** et **Fig. 22.17, page 203**). Cette situation correspond, en moyenne, à 97 % des cas (**Fig. 22.16-b**). Dans les 3 % restants, la protéine GFP-DBCaM-CVIL présente une localisation membranaire et nucléaire.



Fig. 22.17: Effet de la mévinoline (MV) 5 ou 10 μ M sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (photos de microscopie confocale prises à l'objectif x63)

Pour tenter de diminuer d'avantage le contenu des cellules en FPP et en GGPP, la durée du prétraitement à la MV a été augmentée de 3 à 12 heures (durée de contact totale de 27 heures). Dans ces conditions, aucune modification de la localisation intracellulaire des différentes GFPs isoprénylables, farnésylable ou géranylgéranylable, n'a été observée. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Dong et coll. (2002). Dans ce travail, des cellules TBY-2, exprimant stablement une GFP fusionnée en C-terminal avec la séquence génétique entière de OsCaM61 (GFP-OsCaM61), ont été mises en présence de MV 5 µM pendant 36 à 48 heures. Dans les cellules non traitées, la GFP-OsCaM61 a une localisation membranaire (enveloppe nucléaire, réticulum endoplasmique, membrane plasmique). En présence de MV, la localisation de cette protéine devient nucléaire et cytoplasmique. Dans ce cas, le traitement a donc induit une modification de la distribution intracellulaire de la protéine OsCaM61. La présence d'une activité de fixation de calcium potentielle (assurée par le domaine N-terminal de OsCaM61) et un temps de contact plus long avec la MV pourrait être à l'origine de cette divergence de résultats. On peut se demander si la distribution intracellulaire du calcium ne pourrait pas être modifiée sous l'effet de la MV, ou si cet inhibiteur n'aurait pas un effet toxique dû à un temps de contact prolongé.

f. Discussion des résultats

Nos résultats indiquent qu'un traitement des cellules TBY-2 par la MV n'induit aucune modification de la localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIM, GFP-AtRop6-CSIM et GFP-DBCaM-CVIL. La diminution attendue de la teneur en isoprénoïdes cytosoliques, du fait de l'inhibition de l'HMGR, n'a donc eu aucun effet sur la réaction d'isoprénylation des protéines d'intérêt, ce qui implique que des molécules de FPP et GGPP restent disponibles malgré la présence de MV. En plus de la voie du MVA, les plantes possèdent une deuxième voie de biosynthèse des isoprénoïdes localisée dans les plastes (**Fig. 22.18**). Ces deux voies sont en communication et coopèrent (voir Introduction).



Fig. 22.18: Hypothèse de participation de la voie plastidiale du MEP en tant que donneur de substrats et/ou de précurseurs isoprénoïdes pour la réaction de farnésylation et de géranylgéranylation. Cette hypothèse fait suite à un traitement des transformants stables à la mévinoline (MV) qui n'induit pas de changement de localisation intracellulaire des protéines GFP farnésylables (GFP-F) ou de la protéine GFP géranylgéranylable (GFP-GG): la fluorescence verte issue de la protéine GFP-AtRop6-CSIM et de la protéine GFP-DBCaM-CVIL reste localisée majoritairement à la membrane plasmique des cellules TBY-2 ; la protéine GFP-DBCaM-CVIM, est toujours observée au niveau de la membrane plasmique malgré le traitement MV 5μM. Les enzymes sont figurées en bleu (HMGR, 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ; IDI, Isopentényl diphosphate isomérase ; DXS, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase ; GPS, Géranyl diphosphate synthase ; GPS, Géranylgéranyl diphosphate ; JMAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GPP, Géranyl diphosphate ; FPP, Farnésyl diphosphate ; GAPP, Géranyl diphosphate ; G3P, D-Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DXP, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate ; MEP, 2-C-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; GFP-F, protéine verte fluorescente farnésylable; GFP-GG, protéine verte fluorescente géranylgéranylable)

L'hypothèse la plus probable serait donc que les précurseurs des substrats isopréniques nécessaires à l'isoprénylation soient d'origine plastidiale sous forme de molécules d'IPP, exportées pour la synthèse de FPP et de GGPP, ou bien directement de molécules de GGPP.

Pour tester l'hypothèse d'une intervention du plaste dans le processus d'isoprénylation, farnésylation et géranylgéranylation des protéines, nous avons choisi de traiter les cellules à la FOS, un inhibiteur de la voie du MEP.

3.3 La fosmidomycine

a. Données bibliographiques

Actif contre la plupart des bactéries Gram négatives (Mine *et al.*, 1980), la fosmidomycine (FOS) (Okuhara *et al.*, 1980) a été utilisée originellement pour le traitement des infections bactériennes humaines (Murakawa *et al.*, 1982 ; Kuemmerle *et al.*, 1985a ; Kuemmerle *et al.*, 1985b). Elle provoque une diminution de la quantité de ménaquinones et ubiquinones dans les cellules d'*E. Coli* en croissance (Shigi, 1989), car la FOS inhibe la 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) (IC₅₀=8,2nM : Kuzuyama *et al.*, 1998), enzyme clé, située en amont de la voie du MEP. La présence de cette voie alternative chez de nombreuses eubactéries pathogènes dont *Mycobacterium tuberculosis* et *Chlamydia pneumoniae* (Lichtenthaler, 2000) et son absence chez l'homme, en fait une cible d'intérêt considérable, notamment pour le développement de nouvelles substances actives contre ces microorganismes.

Chez le parasite causant la malaria, *Plasmodium falciparum*, les isoprénoïdes sont synthétisés *via* la voie du MEP. La FOS, inhibant la DXR de ce parasite (Jomaa *et al.*, 1999), elle est utilisée en monothérapie pour traiter les cas de malaria non compliqués, traitement bien toléré et efficace (Missinou *et al.*, 2002), qui résulte en une disparition rapide de la fièvre et du parasite. Son utilisation, en combinaison avec la clindamycine, permet d'augmenter l'efficacité d'action de ces deux substances (Wiesner *et al.*, 2003 ; Borrmann *et al.*, 2004a ; Borrmann *et al.*, 2004b).

La FOS, l'inhibiteur le mieux connu de la voie alternative, inhibe aussi la DXR de plante. C'est le cas d'*Arabidopsis* (Schwender *et al.*, 1999; IC₅₀= 0,28 μ M : Müller *et al.*, 2000) et de l'orge (IC₅₀= 0,7 μ M : Müller *et al.*, 2000). En inhibant la DXR, la FOS bloque efficacement la biosynthèse des composés de fin de chaîne de la voie du MEP : caroténoïdes, chlorophylles, phytol et isoprène (Zeidler *et al.*, 1998), et agit donc en tant qu'herbicide chez les plantes (Patterson, 1987 ; Kamuro *et al.*, 1991).

Dans ce travail la FOS a été utilisée pour déterminer si l'inhibition de la DXR plastidiale des cellules de TBY-2 avait un effet sur la localisation intracellulaire des protéines GFP isoprénylables résultant d'un appauvrissement de la cellule en isoprénoïdes plastidiaux, notamment l'IPP et le GGPP.

b. Choix des conditions de traitement des cellules avec la FOS

Les lignées de transformants stables ont été traitées par 40 μ M FOS dans les mêmes conditions que précédemment (**¶3.2-c**.) (**Fig. 22.19-a, page 207**). Il a été montré que cette concentration de FOS bloque la prolifération des cellules TBY-2 (Hemmerlin *et al.*, 2003).

c. Effets de la FOS sur la localisation cellulaire des protéines de fusion GFP

La FOS n'a aucun effet visible sur la localisation intracellulaire des différentes protéines non isoprénylables: GFP, GFP-DBCaM-C/S et GFP-AtRop6-C/S. Elle ne modifie pas non plus la distribution cellulaire du dérivé fluorescent de farnésol.

Le traitement avec 40 μ M de FOS des cellules TBY-2 exprimant les protéines farnésylables GFP-AtRop6-CSIM et GFP-DBCaM-CVIM n'induit aucun changement de la localisation intracellulaire des deux protéines. Il n'en est pas de même en ce qui concerne le traitement avec 40 μ M des transformants stables exprimant la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL. Dans ce cas, la majorité de la fluorescence est présente au niveau du noyau ; la membrane plasmique ne conserve plus qu'un faible marquage.



Ь.



Résultat de 2 expériences indépendantes



Fig. 22.19: Effet d'un traitement fosmidomycine (FOS) 10 ou 40 μ M sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL: conditions de traitement (**a**. ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation majoritaire à la membrane plasmique (MP) ou à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) (**b**.) ; ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées à la FOS 10 ou 40 μ M ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 220 cellules ont été dénombrées en moyenne pour chacun des trois échantillons (non traité, FOS 10 μ M ou FOS 40 μ M). La réparition de la fluorescence dans les cellules traitées à la FOS 10 ou 40 μ M (**c**.) est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ji/</u>) (voir matériel et méthodes) (ME, milieu de culture extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme ; ND, non déterminé)

Des expériences de comptage sur lame en microscopie confocale ont été réalisées afin de quantifier les effets obtenus. Les résultats obtenus démontrent clairement que la FOS a un effet dose-dépendant. Cet effet se traduit par une augmentation du nombre de cellules dans lesquelles la GFP géranylgéranylable a une localisation majoritairement nucléaire et faiblement membranaire, lorsque la concentration en FOS passe de 0 à 40 μ M (**Fig. 22.19-b** et **Fig. 22.20-a**). Dans 67 % des cellules traitées avec 40 μ M de FOS, 92 % de la fluorescence se



FOS 10 µM

FOS 40 µM

b.



FOS 40 µM

Fig. 22.20: Traitement à la fosmidomycine des cellules transgéniques TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL **a**. Effet de la fosmidomycine (FOS) 10 ou 40 μ M sur la distribution cellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (images représentatrices

des cellules observées en majorité lors des deux traitements FOS 10 μ M ou FOS 40 μ M, Fig. 22.19-b)

b. Cellules traitées à la fosmidomycine 40 μ M en fin de cytocinèse

(photos de microscopie confocale prises à l'objectif x63 ; les points de repère sont en rose)

trouvent dans le noyau et seulement 5 % au niveau de la membrane plasmique (Fig. 22.19-c, page 207). La figure 22.20-b (page 208) montre que, dans les cellules en fin de cytocinèse, cette localisation est conservée. La présence dans les cellules d'une fluorescence majoritairement nucléoplasmique et nucléolaire signifie que la majorité des molécules de

۵.

protéine GFP-DBCaM-CVIL ne sont pas isoprénylées, comme l'atteste la localisation exclusivement nucléaire de la protéine GFP-DBCaM-C/S, dont la cystéine du tétrapeptide terminal a été mutée en sérine. Dans ces cellules, la présence d'une fluorescence résiduelle dans la membrane plasmique signifie que l'inhibition de la réaction d'isoprénylation n'est pas totale.

Il est à noter qu'une proportion non négligeable des cellules (34 %) est résistante à l'action de la FOS 40 μM (**Fig. 22.19-b**).

d. Discussion des résultats

Contrairement aux résultats obtenus dans le cas d'un traitement MV, qui n'affecte pas la distribution cellulaire des protéines GFP isoprénylables, un traitement FOS induit deux réponses différentes selon que la protéine est farnésylable ou géranylgéranylable.

La FOS n'affecte pas la localisation des deux protéines farnésylables GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM, qui restent associées à la membrane plasmique malgré l'inhibition de la voie du MEP ou de celle du MVA. En raison de l'existence d'un « crosstalk » existant entre les deux voies, il se pourrait que l'une des voies fournisse les isoprénoïdes nécessaires à la farnésylation des protéines, lorsque l'autre voie est bloquée par l'un des deux inhibiteurs. Par exemple, dans le cas d'un traitement FOS, ce serait la voie cytoplasmique qui fournirait les substrats nécessaires à la réaction d'isoprénylation (**Fig. 22.21, page 210**).

Le traitement FOS 40 µM semble inhiber, dans 67 % des cas (**Fig. 22.19-b**), la géranylgéranylation de la majorité des molécules de protéine GFP-DBCaM-CVIL. Ceci laisse donc supposer que la voie du MEP est un acteur important dans la réaction de géranylgéranylation des protéines. Dans ces conditions, le compartiment plastidial pourrait fournir soit de l'IPP, qui serait ensuite métabolisé dans le cytoplasme par les enzymes de la



Fig. 22.21: Schématisation des conclusions émises quant à l'origine des molécules isoprénoïdes utilisées dans les réactions de farnésylation et géranylgéranylation réalisables suite à un traitement des cellules par la fosmidomycine (FOS) Les enzymes sont en bleu (HMGR, 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ; IDI, Isopentényl diphosphate isomérase ; DXS, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase ; GPS, Géranyl diphosphate synthase ; FPS, Farnésyl diphosphate synthase ; GGPS, Géranylgéranyl diphosphate synthase ; Acétyl-CoA, Acétyl-Coenzyme A ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A ; MVA, Mévalonate ; IPP, Isopentényl diphosphate ; GAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GCPP, Géranyl diphosphate ; GPP, Farnésyl diphosphate ; GPP, Géranylgéranyl diphosphate ; G3P, D-Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DXP, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate ; MEP, 2-*C*-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; *GFP*-F, protéine verte fluorescente farnésylable ; *GFP-GG*, protéine verte fluorescente géranylgéranylable)

voie du MVA en GGPP, soit directement du GGPP. On peut aussi imaginer que le plaste importe du cytosol de l'IPP, qui serait utilisé par la voie du MEP pour synthétiser du GGPP. Le GGPP serait ensuite exporté vers le cytosol et utilisé pour l'isoprénylation de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Ces hypothèses n'excluent pas une contribution directe de la voie du MVA pour la fourniture du GGPP, mais qui ne serait pas majoritaire.

Il est intéressant de noter que le traitement par la FOS 40 induit des effets similaires à ceux provoqués par 40 μ M de GGTI, ce qui confirme que c'est bien la réaction de géranylgéranylation des protéines qui est inhibée.

En résumé, l'inhibition de la voie du MEP inhibe de façon significative la réaction d'isoprénylation d'une protéine géranylgéranylable, ce qui indique que le substrat isoprénique utilisé serait majoritairement d'origine plastidiale. Dans le cas d'une protéine farnésylable, les deux voies semblent coopérer efficacement pour fournir le FPP nécessaire. Afin de confirmer les résultats obtenus dans le cas de la protéine géranylgéranylable, les transformants stables, exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL, ont été traités avec un autre inhibiteur, la kétoclomazone, qui inhibe également la voie du MEP chez les plantes.

3.4 La kétoclomazone

a. Données bibliographiques

La 5-kétoclomazone (ou Kéto) fait partie d'un groupe de métabolites formés à partir de l'herbicide clomazone (Fig. 22.22, page 212) (ElNaggar et al., 1992). Le clomazone produit un blanchiment des feuilles en diminuant, de manière significative, le taux de caroténoïdes et chlorophylles dans les plastes de nombreuses plantes (Sandmann et Böger, 1986), dont le pois, Vigna unguiculata (Duke et Kenyon, 1988), les jeunes plantes de soja (Argenta et Lopes, 1991) et les feuilles d'orge (Zeidler et al., 2000). La cible enzymatique du clomazone n'a, jusqu'à présent, pas encore été définie (Lützow et al., 1990 ; Croteau, 1992). Il n'a pas d'effet sur l'activité des enzymes 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) et 1-Déoxy-Dxylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) (Müller et al., 2000), mais l'un de ses dérivés, la Kéto, bloquerait la DXS de Chlamydomonas (I₅₀ approximatif : 0,1mM ; Müller et al., 2000 ; Müller, 2003). Des études récentes suggèrent que la DXS est une enzyme limitante chez la bactérie (Miller et al., 1999; Kuzuyama et al., 2000; Miller et al., 2000). Chez la tomate (Lois et al., 2000) et Arabidopsis, la DXS est une enzyme limitante de la production de l'IPP plastidial (Estévez et al., 2001). Comme le clomazone, la Kéto provoque une baisse de la quantité de chlorophylles et de caroténoïdes dans les feuilles d'orge (Zeidler et al., 2000), qui peut être réversée par addition de DXP (Zeidler et al., 2000).



Fig. 22.22: Formation de la 5-kétoclomazone et de certains autres dérivés de l'herbicide clomazone (d'après ElNaggar *et al.*, 1992 ; Müller, 2003)

La structure chimique du clomazone est représentée en bleu, celle de la 5-kétoclomazone est en rouge ; les structures de certains autres dérivés du clomazone (5-Hydroxyclomazone ; 2,2-Diméthyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxyamino]-propane (DOCHP) ; 4,4-Diméthyl-3-isoxazolidinone) sont aussi représentées.

b. Conditions de traitement des cellules par la Kéto

Comme précédemment, les différentes lignées ont été prétraitées 3 heures avec la kétoclomazone (Kéto), avant d'être mises en contact avec la dexaméthasone 10 μ M, qui induit la biosynthèse des protéines GFPs (**Fig. 22.24-a**).

Un des problèmes qui se posent concerne le choix de la concentration en Kéto à utiliser pour traiter les cellules de tabac BY-2. Il a été montré que la formation de la chlorophylle et des caroténoïdes chez l'orge est inhibée par une concentration de 10 μ M de Kéto (Zeidler *et al.*, 2000) et que l'émission d'isoprène dans les feuilles de plusieurs plantes est bloquée en présence de Kéto 1 mM (Zeidler *et al.*, 2000). Ainsi, les cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL ont été traitées avec des concentrations en Kéto comprises entre 5 μ M et 1 mM.

c. Effets de la Kéto sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP géranylgéranylable

En présence d'une concentration de 5 µM de kétoclomazone (Kéto), un effet faible mais significatif sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL est observé. Il se traduit par la présence d'un petit nombre de cellules dans lesquelles la fluorescence verte a une localisation à la fois nucléaire et membranaire, alors que, dans le contrôle non traité, la GFP-DBCaM-CVIL est seulement membranaire (**Fig. 22.23, page 214**). Cet effet dépend de la dose appliquée. Après traitement avec une concentration de 1 mM, toutes les cellules présentent une fluorescence localisée uniquement dans le noyau (**Fig. 22.23-g**). Il faut garder à l'esprit cependant qu'à cette dose d'inhibiteur d'éventuels effets toxiques sont à craindre.

La Kéto provoque donc un changement de la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Afin de quantifier cet effet, des expériences statistiques ont été réalisées en utilisant des concentrations en Kéto identiques à celles employées lors des traitements FOS. Les concentrations choisies ont été de 10 et 40 μ M. Les expériences de comptage sur lame montrent que la Kéto 10 μ M entraîne une augmentation d'environ 40 % du nombre de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation fortement nucléaire



Fig. 22.23: Les transformants TBY-2 sont traités avec différentes concentrations de kétoclomazone (Kéto), 3 heures avant d'induire la Fig. 22.25. Les transformants FB Y-2 sont traites avec différences concentrations de keté biosynthèse des protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S ou GFP-DBCaM-CVIL
a. Cellule exprimant la protéine GFP non fusionnée
b. Cellule exprimant une protéine GFP non isoprénylable GFP-DBCaM-C/S (contrôle)

c. Cellule non traitée exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL

d. -**g**. Cellules représentatives de la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL dans une population traitée à la Kéto 5 μ M (**d**.), 10 μ M (**e**.), 40 μ M (**f**.) ou 1 mM (**g**.) (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)



et faiblement membranaire par rapport à un contrôle non traité (Fig. 22.24-b). Une

Fig. 22.24: Effet de la kétoclomazone (Kéto) 10 μ M et 40 μ M sur la distribution cellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL: conditions de traitement (**a**. ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation majoritaire à la membrane plasmique (MP) ou à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) (**b**.) ; ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées par la Kéto 10 ou 40 μ M ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 300 cellules traitées (**c**.) est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>) (voir matériel et méthodes) (ME, milieu de culture extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme ; ND, non déterminé)
concentration en Kéto de 40 μ M augmente encore d'environ 37 % le nombre de cellules ayant cette même distribution de fluorescence (**Fig. 22.24-b** et **Fig. 22.25-a**). Dans ces cellules en



Kéto 10 µM

Kéto 40 µM



Fig. 22.25: Effet de la kétoclomazone sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL

a. Deux cellules de tabac représentatives, traitées avec de la kétoclomazone 10 µM ou 40 µM (Kéto 10 µM ou Kéto 40 µM) pendant 18 heures, sont observées au microscope confocal (objectif x63)

b. Traitées à la kétoclomazone 40 µM, les cellules se divisent: sont représentées, une cellule en mitose ainsi qu'une cellule en fin de cytocinèse/début de phase G1 Interplaasecretopoutroles dieux concent nations de la concentration of the concentration of the cytocinèse/début de phase G1 formée séparant les deux cellules filles, soit une métaphase probable ; N, noyau ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

de la fluorescence totale (Fig. 22.24-c). Au moment de la mitose, cette fluorescence nucléaire

devient cytosolique, pour se relocaliser dans le noyau en début de phase G1 et tout au long de l'interphase ; par contre, la membrane plasmique reste toujours faiblement fluorescente au cours du cycle cellulaire (**Fig. 22.25-b**).

Il faut noter que la Kéto ne change pas la distribution intracellulaire de la GFP et de la protéine non isoprénylable GFP-DBCaM-C/S quelque soit la dose utilisée de 10 ou 40 µM.

d. Discussion des résultats

La Kéto provoque un changement de localisation de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Alors que dans les cellules non traitées, cette protéine est exclusivement membranaire, elle s'accumule dans le noyau, ce qui indique que la Kéto a inhibé l'isoprénylation de cette protéine géranylgéranylable. Ces effets sont tout à fait similaires à ceux induits par la FOS et le GGTI-2133. Cependant, nos résultats montrent qu'à la même concentration, la Kéto est un inhibiteur plus efficace (**Fig. 22.19, page 207, Fig. 22.24, page 215 et Fig. 1.68, page 133**).

Comme la FOS, la Kéto est capable d'interférer avec la voie du MEP et l'ensemble des résultats obtenus avec les trois inhibiteurs démontre clairement que, dans les cellules TBY-2, le substrat de la réaction de géranylgéranylation des protéines provient en grande majorité du plaste.

En raison de l'existence d'une coopération entre les deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes dans les cellules TBY-2 (Hemmerlin et al., 2003), nous avons voulu compléter cette étude en testant les effets de l'inhibition des deux voies sur la localisation intracellulaire des protéines farnésylables et géranylgéranylable.

3.5 Inhibition des deux voies par la FOS et la MV

a. Conditions de traitement

Afin de bloquer les voies de biosynthèse du MEP et du MVA, les lignées transgéniques de tabac ont été traitées à la fois par la FOS 40 μ M et la MV 5 μ M, 3 heures avant l'addition de la DEX 10 μ M, qui induit la biosynthèse des différentes protéines GFPs (**Fig. 22.28-a**). La durée totale de l'expérience reste inchangée (18 heures).

b. Effets du double traitement FOS/MV sur la distribution intracellulaire des protéines GFP farnésylables

Le double traitement FOS/MV ne modifie pas la localisation intracellulaire des protéines GFP, GFP-DBCaM-C/S et GFP-AtRop6-C/S. Il ne change pas non plus la localisation du dérivé de farnésol fluorescent dans la cellule.

L'inhibition des deux voies de biosynthèse par la FOS 40 µM et la MV 5 µM, n'affecte pas la distribution cellulaire des protéines GFP farnésylables, GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM, qui restent associées à la membrane plasmique (Fig. 22.26-a, page **219** et 22.27-a, page 220), ce qui indique que la réaction de farnésylation n'a pas été inhibée et que le FPP nécessaire est resté disponible. Ces résultats surprenants nous ont conduit à modifier les conditions de traitement. Un prétraitement par les inhibiteurs de 12 heures au lieu de 3 heures avant induction ne modifie pas davantage la distribution des protéines farnésylables. Nous avons alors testé les effets de doses plus élevées d'inhibiteurs. Les figures 22.26-a et 22.27-a montrent les effets d'un traitement de 18 heures des transformants, avec 50 µM de FOS et 50 µM de MV, sur la localisation intracellulaire des protéines GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM. Dans ces conditions, les cellules exprimant la protéine GFP-AtRop6-CSIM présentent une répartition de fluorescence nucléaire et cytosolique similaire à celle des cellules exprimant la protéine GFP-AtRop6-C/S (Fig. 22.27-b). Pour les cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIM, deux types de réponses ont été obtenues (Fig. 22.26-a et b). Dans certaines cellules, la GFP-DBCaM-CVIM a une localisation exclusivement nucléaire, comme la protéine GFP-DBCaM-C/S (Fig. 22.26-b), et dans d'autres, cette protéine est nucléaire, mais aussi faiblement membranaire. Ce marguage de la membrane plasmique, qui est plus intense à l'endroit où les cellules sont contiguës, est difficile à numériser (Fig. 22.26-a, flèches roses). Cette fluorescence membranaire pourrait indiquer que l'inhibition par les deux composés, FOS et MV, n'est pas totale, malgré les fortes doses employées.

a. GFP-DBCaM-CVIM



b. GFP-DBCaM-C/S



Fig. 22.26: Récapitulatif des traitements des cellules transgéniques exprimant la protéine farnésylable GFP-DBCaM-CVIM (**a**.) Les cellules, en phase stationnaire de croissance, sont repiquées, mises en présence de(s) inhibiteurs 3 heures avant l'ajout de dexaméthasone 10 μ M. L'ensemble est cultivé dans les conditions classiques pendant 15 heures (durée du traitement 18 heures) avant observation sous microscope confocal (objectif x63). Les différents inhibiteurs et les concentrations utilisés dans ces traitements sont les suivants: mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M), fosmidomycine 40 μ M (FOS 40 μ M), fosmidomycine 40 μ M et mévinoline 5 μ M (FOS 40 μ M + MV 5 μ M) ou encore fosmidomycine 50 μ M et mévinoline 50 μ M (FOS 50 μ M + MV 50 μ M). La protéine GFP-DBCaM-C/S (**b**.), contrôle non isoprénylable, est exprimée sous l'effet de la dexaméthasone 10 μ M mise en présence des cellules pendant 15 heures avant l'observation au microscope confocal.

Les flèches roses soulignent la membrane plasmique (MP) faiblement fluorescente. La barre représente 10 µm.

a. GFP-AtRop6-CSIM



b. GFP-AtRop6-C/S



Fig. 22.27: Récapitulatif des traitements des cellules transgéniques exprimant la protéine farnésylable GFP-AtRop6-CSIM (**a**.) Les cellules, en phase stationnaire de croissance, sont repiquées, mises en présence de(s) inhibiteurs 3 heures avant l'ajout de dexaméthasone 10 μ M. L'ensemble est cultivé dans les conditions classiques pendant 15 heures (durée du traitement 18 heures) avant observation sous microscope confocal (objectif x63). Les concentrations utilisées sont de 5 ou 50 μ M pour la mévinoline (MV 5 μ M, MV 50 μ M) et 40 ou 50 μ M pour la fosmidomycine (FOS 40 μ M, FOS 50 μ M). Le contrôle (**b**.) correspond à une protéine non isoprénylable, GFP-AtRop6-C/S, dont la biosynthèse a été induite à la dexaméthasone 10 μ M pendant 15 heures. Dans ce cas, les cellules TBY-2 n'ont pas été traitées. La barre blanche représente 10 μ m

La localisation nucléaire des protéines GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM dans les cellules TBY-2 traitées par 50 µM de FOS et de MV démontre clairement que ces protéines n'ont pas été isoprénylées. Ce résultat résulte essentiellement de l'augmentation d'un facteur 10 de la concentration en MV, par rapport à l'expérience précédente. La conséquence majeure serait une inhibition plus importante de l'HMGR, entraînant une

diminution significative de la quantité des molécules de FPP disponibles pour la réaction de farnésylation. On peut donc en déduire que le substrat isoprénique nécessaire à la synthèse des protéines farnésylées serait majoritairement d'origine cytosoplasmique.

Il s'agira, par la suite, de vérifier s'il est possible d'obtenir les mêmes effets avec une concentration en MV inférieure à 50 µM, ceci afin d'éviter d'éventuels effets cytotoxiques.

c. Effets du double traitement FOS/MV sur la distribution cellulaire de la protéine GFP géranylgéranylable

La localisation de la GFP géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL est modifiée par un double traitement FOS 40 μ M et MV 5 μ M. Dans ce cas, la majorité des cellules (84 %) présente une fluorescence exclusivement nucléaire (nucléoplasme et nucléole(s)) (**Fig. 22.28-b**, **c, page 222** et **Fig. 22.29, page 223**). Dans 12 % des cas (**Fig. 22.28-b**), la fluorescence verte est localisée majoritairement dans le noyau (80 % de l'intensité lumineuse totale) mais aussi dans la membrane plasmique (15 % de l'intensité de fluorescence, **Fig. 22.28-c**). Enfin, 4 % des cellules traitées présentent une localisation intracellulaire identique à celle d'un contrôle non traité et sont donc résistantes à l'action des inhibiteurs (**Fig. 22.28-b**).

Il est important de noter que les conditions de traitement utilisées n'affectent pas l'état physiologique des cellules TBY-2, comme le montrent l'utilisation du marqueur de viabilité, le MitoTracker[®] (révélation des mitochondries) (**Fig. 22.29**), et l'existence d'évènements de division dans la population cellulaire (**Fig. 22.30**, **page 224**).

La distribution de la protéine GFP-DBCaM-CVIL change au cours du cycle cellulaire (**Fig. 22.30**). Alors qu'en interphase, la fluorescence verte est exclusivement nucléaire, elle devient cytosolique au moment de la mitose (**Fig. 22.30**). Ceci est probablement dû à la rupture de l'enveloppe nucléaire à ce stade du cycle. La protéine GFP-DBCaM-CVIL diffuse et se répartit alors uniformément dans la cellule. Une fluorescence verte légèrement plus intense colocalise avec des structures, dont le volume est révélé en DIC, et qui pourraient correspondre à des chromosomes (Flèches roses, **Fig. 22.30**). La protéine GFP



Fig. 22.28: Effet d'un double traitement à la fosmidomycine (FOS) 40 μ M et à la mévinoline (MV) 5 μ M sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL: conditions de traitement (**a**. ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation qui est soit majoritaire à la membrane plasmique (MP), soit à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N), soit exclusivement nucléaire (N) (**b**.) ; ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 190 cellules ont été observées en moyenne pour chacun des deux échantillons (contrôle ou traité FOS et MV). La répartition de la fluorescence dans les cellules traitées FOS 40 μ M et MV 5 μ M (**c**.) est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ii/</u>) (voir matériel et méthodes) (ME, milieu de culture extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme)



FOS 40 μM + MV 5 μM FOS 40 μM + MV 5 μM + MitoTracker

Fig. 22.29: Sous l'effet d'un traitement par la fosmidomycine (FOS) 40 μ M et par la mévinoline (MV) 5 μ M, 84,3 % des cellules TBY-2 présentent une localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL exclusivement nucléaire: observation d'une cellule représentative de l'effet d'un tel traitement (microscopie confocale, objectif x63). Les cellules doublement traitées FOS-MV sont dans un état physiologique correct comme l'atteste la fluorescence rouge des mitochondries liée au marqueur MitoTracker

géranylgéranylable possède en C-terminal une région ayant des propriétés basiques. Les résidus de ce domaine, chargés positivement, pourraient interagir avec l'ADN chromosomique, expliquant ainsi la présence d'un marquage fluorescent plus intense à ce niveau. Après la mitose, la protéine GFP-DBCaM-CVIL se relocalise exclusivement dans les deux noyaux des cellules filles (**Fig. 22.30, page 224**).

Ce double traitement provoque donc une inhibition presque totale de l'association à la membrane plasmique de la GFP-DBCaM-CVIL, qui s'accumule dans le noyau, comme dans le cas de la protéine contrôle non géranylgéranylable GFP-DBCaM-C/S.



Fig. 22.30: Figures de division observables dans un échantillon cellulaire exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL et traité à la fosmidomycine 40 μ M et à la mévinoline 5 μ M (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; les points de repère sont en **rose** ; les flèches **roses** indiquent probablement les chromosomes cellulaires ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

Lorsque la durée de traitement des cellules par les inhibiteurs est allongée (Fig. 22.31a), les effets observés sont moins importants (Fig. 22.31-b et c). En effet, après une durée de contact en présence de FOS/MV de 43 h au lieu de 18 h, la proportion de cellules exprimant une protéine GFP-DBCaM-CVIL nucléaire passe de 91 à 19 % (Fig. 22.31-b et c). Dans ces conditions, on peut imaginer que les concentrations d'inhibiteurs ne soient plus suffisantes en



Fig. 22.31: Effet d'un traitement à long terme sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Les différents traitements (mévinoline 5 μ M, MV 5 μ M ; mévinoline 10 μ M, MV 10 μ M ; fosmidomycine 10 μ M, FOS 10 μ M ; fosmidomycine 40 μ M, FOS 40 μ M + MV 5 μ M) ont été réalisés pendant 18 heures et 43 heures (a., DEX 10 μ M, dexaméthasone 10 μ M ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction). L'effet de ces traitements est évalué par des expériences de statistique, qui consistent en des comptages sur lame des cellules dont la fluorescence est localisée à la membrane plasmique (MP), est membranaire et nucléaire (MP+N) ou encore exclusivement nucléaire (N). Le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées.

raison de la multiplication des cellules (environ 2 cycles cellulaires).

3.6 Inhibition des deux voies par la Kéto et la MV

Ce double traitement par la Kéto 40 μ M et la MV 5 μ M a été réalisé avec des cellules exprimant la protéine GFP-DB-CaM-CVIL, dans des conditions identiques (**Fig. 22.32-a**) à celles utilisées dans le cas d'un traitement FOS/MV.



Fig. 22.32: Effet de la kétoclomazone (Kéto) 40 µM et de la mévinoline (MV) 5 µM sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL

a. Conditions de traitement

b. Comptage sous microscope à fluorescence ; 260 cellules ont été observées en moyenne par échantillon traité ou non traité

c. Répartition de la fluorescence intracellulaire (Logiciel Image J)

Le traitement des lignées à la fois par la Kéto 40 μ M et la MV 5 μ M modifie de façon importante la distribution intracellulaire de la GFP protéine géranylgéranylable, puisque presque toutes les cellules observées ont une fluorescence nucléaire. Une grande majorité d'entre elles (90 % des cellules) a une fluorescence localisée exclusivement dans le noyau (**Fig. 22.32-b** et **Fig. 22.33-a**). Les autres cellules (environ 10 %) (**Fig. 22.32-b**) ont une



Kéto 40 μM + MV 5 μM

Kéto 40 μM + MV 5 μM + MitoTracker





Fig. 22.33: Effet de la kétoclomazone 40 μ M (Kéto 40 μ M) et de la mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M) sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL et marquage rouge des mitochondries (MitoTracker) (**a**.). Les cellules traitées Kéto 40 μ M et MV 5 μ M se divisent (**b**.): sont visualisées, une cellule TBY-2 en mitose dont les chromosomes semblent observables ainsi qu'une cellule en fin de cytocinèsedébut de phase G1 dont les deux noyaux n'ont pas encore migré au centre de chaque cellule nouvellement formée (Photos de microscopie confocale, objectif x63 ; N, noyau ; les points de repère sont figurés en rose ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski) fluorescence nucléaire (91 % de l'intensité de fluorescence cellulaire (**Fig. 22.32-c**)) et faiblement membranaire (6 % de l'intensité de fluorescence cellulaire (**Fig. 22.32-c**)).

Après 18 heures de contact avec les inhibiteurs, la population cellulaire observée contient des cellules qui se multiplient. Des figures de mitose sont visibles, dans lesquelles la fluorescence verte est dispersée dans le cytosol (**Fig. 22.33-b**) alors que dans les cellules en interphase, pratiquement toute la fluorescence est localisée dans le noyau (**Fig. 22.33-a**). Lorsque les noyaux des deux cellules filles sont reformés après la mitose, la protéine GFP-DBCaM-CVIL retrouve sa localisation nucléaire (**Fig. 22.33-b**). Le double traitement Kéto/MV n'empêche donc pas la division cellulaire.

La répartition intracellulaire de la fluorescence dans les cellules exprimant les protéines GFP et GFP-DBCaM-C/S n'est pas affectée par un traitement Kéto/MV.

Ce double traitement a eu pour effet de changer la distribution de la protéine GFP-DBCaM-CVIL dans la cellule. Dans ces conditions, la localisation majoritairement nucléaire de cette protéine fluorescente est comparable à celle d'une GFP non isoprénylable. La protéine GFP-DBCaM-CVIL n'a donc pas subi de modification post-traductionnelle. Cette inhibition de l'isoprénylation par la Kéto est accentuée par la MV, comme le montre l'augmentation du nombre de cellules dans la suspension ayant une localisation exclusivement nucléaire.

La Kéto, en présence ou en absence de MV, induit les mêmes effets que la FOS+/-MV sur la répartition intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Ce composé inhibe donc l'isoprénylation d'une GFP géranylgéranylable en diminuant la synthèse de GGPP.

3.7 Conclusions sur l'inhibition des deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes

Ces expériences de double traitement, FOS/MV ou Kéto/MV, des transformants par des inhibiteurs spécifiques de chacune des voies de biosynthèse des isoprénoïdes, respectivement, celle du MEP (plastidiale) et celle du MVA (cytoplasmique), ont permis de mettre en évidence un changement de localisation intracellulaire de toutes les protéines d'intérêt farnésylables et géranylgéranylables. Suite au déficit en intermédiaires

biosynthétiques des deux compartiments, aucune réaction d'isoprénylation n'a pu avoir lieu, avec comme conséquence, l'accumulation des substrats protéiques dans le noyau.

Dans le cas des protéines farnésylables GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM, le changement de distribution cellulaire, de la membrane plasmique au noyau, a été obtenu en utilisant une concentration élevée en MV (50 µM). La MV est connue pour être un inhibiteur très efficace de l'HMGR (Hemmerlin et Bach, 1998). Dans ce contexte, l'absence d'effet d'un traitement des cellules avec 5 µM de MV, en présence et en absence de 40 µM de FOS, sur la distribution des protéines farnésylables peut surprendre. Rappelons que, dans les cellules végétales, l'HMGR est codée par une famille de gènes (Bach *et al.*, 1991). Dans la voie du MVA, le FPP occupe une position centrale, à partir de laquelle les unités isopréniques sont dirigées vers les stérols et divers isoprénoïdes non stéroliques (sesquiterpènes, ubiquinone, polyprénols ou protéines) (**Fig. I.12, page 22**). Selon une hypothèse proposée récemment (Chappell, 1995), ces différentes classes d'isoprénoïdes seraient formées au sein de véritables canaux métaboliques (métabolons), impliquant, vraisemblablement, des isoformes distinctes d'HMGR. Ainsi, on peut imaginer qu'il existerait une HMGR dédiée spécifiquement à la farnésylation des protéines et possédant des propriétés catalytiques différentes des autres isoformes, en particulier une sensibilité moins grande à la MV.

La localisation de la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL est elle aussi modifiée par l'inhibition simultanée des voies du MEP et du MVA. Dans les cellules traitées par les deux inhibiteurs FOS/MV ou Kéto/MV, cette protéine est localisée exclusivement dans le noyau. Aucune fluorescence résiduelle n'est retrouvée au niveau de la membrane plasmique, contrairement à la situation obtenue dans le cas d'un traitement avec uniquement 40 µM de FOS ou 40 µM de Kéto. Ce résultat démontre que l'inhibition des deux voies est nécessaire pour inhiber complètement la réaction de géranylgéranylation. L'existence d'une faible fluorescence associée à la membrane plasmique, en présence de FOS ou Kéto uniquement, pourrait résulter d'un import, par le plaste, de précurseurs isopréniques cytosoliques (*i.e.* IPP). Ces précurseurs seraient alors utilisés pour former, à l'intérieur du plaste, du GGPP, qui à son tour serait exporté dans le cytosol pour servir de substrat à la protéine GGTase-I. On peut aussi proposer une faible participation directe de la voie du MVA à la synthèse du GGPP.

En conclusion, ces résultats démontrent clairement que la voie du MVA participe aussi à la synthèse du GGPP nécessaire à la géranylgéranylation des protéines, même si cette participation est minoritaire par rapport à celle de la voie du MEP.

4. Inhibition des deux voies de biosynthèse et réversion par un intermédiaire biosynthétique isoprénique

Seule la lignée cellulaire exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL a été utilisée lors des expériences suivantes.

4.1 Effets de l'addition de mévalonate sur des cellules traitées par la FOS et par la MV

a. Le mévalonate

Le mévalonate (MVA) est le produit de la réaction catalysée par l'enzyme HMGR à partir de l'HMG-CoA, réaction située en amont de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes cytoplasmiques (**Fig. I.12, page 22**). Cette molécule, introduite dans le milieu de culture cellulaire est capable de réverser certains effets liés à l'inhibition de l'HMGR par les statines. Le MVA restaure, par exemple, la croissance de cellules d'artères humaines (Corsini *et al.*, 1993) ou celle des cellules myocytaires bronchiales humaines en culture (Vigano *et al.*, 1995), traitées à la simvastatine. Il permet aussi de rétablir la prolifération de cellules musculaires lisses, issues d'artères de rat, traitées avec différentes statines (Raiteri *et al.*, 1997). Dans les cellules de tabac BY-2, le MVA réverse l'effet inhibiteur de la mévinoline (Crowell et Salaz, 1992), en favorisant la reprise de la croissance (Hemmerlin, 1997). En absence de statine, le MVA stimule la prolifération des TBY-2 (Hemmerlin, 1997) et induit, entre autre, une augmentation de la biosynthèse des phytostérols dans des cultures de céleri (Wilkinson *et al.*, 1994).

L'introduction de MVA marqué au ¹⁴C ou au ³H, a permis de révéler l'existence de protéines isoprénylées chez les animaux (Schmidt *et al.*, 1984) et chez les plantes (Randall *et al.*, 1993 ; Swiezewska *et al.*, 1993 ; Shipton *et al.*, 1995 ; voir Chapitre I, ¶ **1.3-b**.).

Ces données montrant une réversion, par le MVA exogène, des effets liés à un traitement des cellules par les statines, et une incorporation possible de produits dérivés du MVA dans les protéines, justifient l'utilisation de ce précurseur dans notre étude. En effet, nous avons montré qu'il semble exister une faible participation de la voie du MVA dans l'isoprénylation de la GFP géranylgéranylable. Pour de confirmer ce résultat, les transformants traités à la FOS/MV ont été mis en présence de MVA exogène, afin de déterminer si ce composé peut annuler l'action des inhibiteurs. Une réponse positive doit se traduire par un changement visible de la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Majoritairement nucléaire après un traitement FOS/MV, elle devrait devenir membranaire après addition de MVA.

b. Choix de la concentration en MVA à utiliser et conditions de traitement

Il a été montré que le MVA, utilisé à des concentrations de l'ordre du millimolaire (5, 2 et 6 mM), permet de lever progressivement l'inhibition de la prolifération cellulaire provoquée par un traitement des cellules TBY-2 par la MV 5 μ M (Hemmerlin, 1997). L'effet maximal est obtenu pour une concentration égale à 6 mM (Hemmerlin, 1997), une concentration qui est toxique pour d'autres types de lignées cellulaires comme les suspensions cellulaires de persil (Haudenschild, 1995).

Il a été montré, dans le cas des cellules d'ovaire de hamster chinois (« CHO »), dans lesquelles la synthèse du MVA a été inhibée, que l'incorporation de ce précurseur dans les isoprénoïdes de fin de chaîne, ainsi que dans les protéines isoprénylées, est fonction de la concentration de MVA (Rilling *et al.*, 1993). En présence de faibles concentrations en MVA, la synthèse de la farnésyl-cystéine prédomine, alors que celle de la géranylgéranyl-cystéine est favorisée par des concentrations plus élevées.

Ainsi nous avons choisi de tester les effets de concentrations croissantes de MVA comprises entre 0,5 et 5 mM sur la localisation de la fluorescence de la GFP-DBCaM-CVIL.

Typiquement, les cellules sont mises en présence de MV 5 μ M et FOS 40 μ M, 3 heures avant l'ajout simultané de dexaméthasone 10 μ M et de MVA 0,5 à 5 mM. Le prétraitement par les inhibiteurs permet d'appauvrir la cellule en isoprénoïdes cytosoliques et plastidiaux avant l'induction de la synthèse de la GFP géranylgéranylable. Au moment de l'induction le MVA exogène sera alors la source majoritaire de molécules isoprénoïdes disponibles. L'effet de ce traitement est observé, comme habituellement, sous microscope confocal, après 15 heures (**Fig. 22.34-a**).



Fig. 22.34: Essais de réversion par le mévalonate (MVA) des effets créés par une double inhibition fosmidomycine (FOS) 40 μ M et mévinoline (MV) 5 μ M: conditions de traitement (**a**. ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation majoritaire à la membrane plasmique (MP), à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) ou exclusivement nucléaire (N) (**b**.) ; ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules observées ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées.

c. Effets du MVA sur la localisation in vivo de la protéine GFP géranylgéranylable

Les premières observations sous microscope confocal montrent un effet du MVA sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Pour de fortes doses de MVA (à partir de 2-3 mM), la totalité des cellules présentent, une répartition de la fluorescence verte identique à celle d'un contrôle non traité (par les inhibiteurs et par le MVA). L'addition de MVA permet donc de lever l'inhibition FOS/MV. Afin de confirmer et de quantifier ces effets, des expériences statistiques ont été réalisées. Dans ce cas, différentes doses de MVA exogène inférieures à 3 mM, une concentration à première vue suffisante pour annuler totalement l'effet des inhibiteurs, ont été utilisées. Ces expériences confirment que le MVA réverse bien l'inhibition des voies du MVA et du MEP. L'effet de ce précurseur est progressif et dépendant de la dose appliquée (Fig. 22.34-b). Plus la concentration en MVA ajouté dans le milieu est importante, plus la réversion, qui se traduit par une augmentation du nombre de cellules ayant une localisation membranaire de la fluorescence (MP), est grande. Cet effet est maximal pour une concentration égale à 3 mM. A cette dose, 100 % des cellules retrouvent une distribution de la protéine GFP-DBCaM-CVIL identique à celle observée dans un contrôle non traité (Fig. 22.34-b et Fig. 22.35). Cette dose de 3 mM sera utilisée comme concentration de référence dans la suite des expériences réalisées.



Fig. 22.35: Une concentration en mévalonate (MVA) de 3 mM réverse totalement les effets d'un double traitement par la fosmidomycine 40 μ M (FOS 40 μ M) et par la mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M) sur la distribution cellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL ; l'échantillon non traité correspond à une population cellulaire qui n'a pas été mise en présence de FOS, MV ou MVA ; les photos ont été réalisées avec l'objectif x63 du microscope confocal ; la barre blanche représente 10 μ m.

d. Discussion des résultats

L'addition de mévalonate (MVA) 3 mM à des cellules traitées par la FOS/MV réverse totalement les effets provoqués par ces inhibiteurs (**Fig. 22.36**). Dans ces conditions, l'ensemble de la fluorescence de la protéine GFP géranylgéranylable se localise exclusivement à la membrane plasmique. Cette localisation membranaire indique que l'ensemble des molécules de GFP-DBCaM-CVIL exprimées sont modifiées posttraductionnellement.



Fig. 22.36: Schématisation des conclusions déduites des essais de réversion, par le MVA exogène, de l'inhibition des deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes. Le blocage des deux voies a été réalisé grâce à un traitement mévinoline (MV) et fosmidomycine (FOS) des transformants stables exprimant une GFP géranylgéranylable. Ces expériences permettent de confirmer la participation de la voie du MVA en tant que donneur de substrat isoprénoïde pour l'isoprénylation d'une GFP géranylgéranylable

Les enzymes sont en bleu (HMGR, 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ; IDI, Isopentényl diphosphate isomérase ; DXS, 1-Déoxy-D-xylulose 5phosphate synthase ; DXR, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase ; GPS, Géranyl diphosphate synthase ; FPS, Farnésyl diphosphate synthase ; GGPS, Géranylgéranyl diphosphate ; synthase ; Acétyl-CoA, Acétyl-Coenzyme A ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A ; MVA, Mévalonate ; IPP, Isopentényl diphosphate ; DMAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GPP, Géranyl diphosphate ; FPP, Farnésyl diphosphate ; GGPP, Géranylgéranyl diphosphate ; G3P, D-Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DXP, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate ; MEP, 2-C-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; GFP-66, protéine verte fluorescente géranylgéranylable).

Le MVA exogène est responsable de la localisation de la protéine GFP-DBCaM-CVIL à la membrane plasmique lorsque les deux voies du MVA et du MEP sont inhibées. Le substrat nécessaire à la géranylgéranylation de la protéine est donc bien une molécule d'origine isoprénique. Ce substrat pourrait être synthétisé à partir du MVA exogène directement par la voie cytoplasmique, ce qui confirmerait que cette voie peut participer à la synthèse des protéines géranylgéranylées, comme montré précédemment (**Fig. 22.36**). Cette participation de la voie du MVA n'exclue pas une intervention de la voie du MEP. Selon cette hypothèse, l'apport important de MVA stimulerait l'entrée de précurseurs isopréniques (comme l'IPP) dans le plaste, dont la voie de biosynthèse a été bloquée par la FOS. Ces molécules importées pourraient être utilisées par les enzymes de la voie plastidiale pour synthétiser du GGPP, qui serait ensuite exporté dans le cytosol pour la géranylgéranylation de la protéine fluorescente. Ainsi, l'addition de MVA exogène a permis de réverser efficacement l'inhibition de la voie du MEP, ce qui n'avait pu être observé dans les expériences précédentes réalisées en absence de MVA. Sans cet apport de MVA, la voie cytoplasmique n'est donc pas capable de synthétiser suffisamment de molécules de précurseur pour lever l'inhibition de la voie du MEP par la FOS ou la Kéto.

En conclusion, nos expériences confirment le fait que la voie cytoplasmique fournit une partie du substrat nécessaire pour isoprényler une GFP géranylgéranylable.

4.2 Essais de complémentation de l'inhibition FOS/MV et FOS/Kéto par des isoprénols

Il nous a semblé intéressant de tester si d'autres isoprénoïdes exogènes étaient capables de réverser les effets des inhibiteurs FOS/MV sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Notre choix s'est porté sur les dérivés alcools des deux substrats de la réaction d'isoprénylation, FPP et GGPP, à savoir, le farnésol (Fol) et le géranylgéraniol (GGol). Ces isoprénols sont mieux absorbés par la cellule que les composés diphosphates correspondants.

a. Existence d'une voie de recyclage pour le farnésol et le géranylgéraniol

L'existence de farnésol (Fol) libre dans les cellules de mammifères a été rapportée il y a plus de 40 ans (Schroepfer et Gore, 1963). Le Fol et le géranylgéraniol (GGol) sont des isoprénols cellulaires naturels, qui peuvent être formés respectivement à partir du FPP et du GGPP, grâce à deux activités allyl diphosphatase distinctes, identifiées dans les microsomes de foie de rat (Bansal et Vaidya, 1994). Le Fol et le GGol pourraient aussi provenir du « turnover » des protéines isoprénylées. En effet, il a été montré qu'une prényl-cystéine lyase permet la dégradation du produit de protéolyse des protéines farnésylées, le farnésyl-cystéine, en cystéine et farnésol (Zhang *et al.*, 1997b). Il existerait donc un système de recyclage de ces isoprénols pour reformer les dérivés diphosphate allyliques respectifs. Un tel système joue un rôle important, puisque le Fol comme le GGol sont deux molécules cytotoxiques (Voir ¶ **4.2d**.). Il a été montré que des extraits de microalgue (Inoue *et al.*, 1994), de *Haloferax volcanii* (Tachibana *et al.*, 1996) ou de microsomes et de peroxisomes de foie de rat (Westfall *et al.*, 1997), sont capables de catalyser la conversion *in vitro* du Fol en FP et FPP. Ces réactions sont catalysées grâce à une farnésol kinase et une farnésyl phosphate kinase (Bentinger *et al.*, 1998). Dans le cas du GGol, il a été montré que des fractions membranaires et solubles de *Sulfolobus acidocaldarus* catalysent la phosphorylation de cet isoprénol en GGP (Ohnuma *et al.*, 1996). Chez les plantes, les microsomes de *Nicotiana tabacum*, contiennent un système enzymatique efficace capable de modifier le farnésol libre en FPP, grâce à deux réactions de monophophorylation successives (Thai *et al.*, 1999). Ces mêmes fractions catalysent aussi la conversion enzymatique du GGol en GGP et GGPP (Thai *et al.*, 1999). Ces données démontrent la métabolisation, dans des cellules de tabac, de ces deux isoprénols, dont nous souhaitons tester les effets.

Il existerait donc des voies cellulaires de recyclage du Fol et du GGol. Ces voies seraient en relation avec la voie biosynthétique conventionnelle des isoprénoïdes. Chez les animaux, elles permettraient la métabolisation des deux isoprénols en FPP et GGPP nécessaires à l'isoprénylation des protéines (Fig. 22.37, page 237) (Crick *et al.*, 1997b). Les mêmes réactions de recyclage du Fol et du GGol pourraient avoir lieues chez les végétaux (Thai *et al.*, 1999).

b. Incorporation du farnésol et du géranylgéraniol dans les protéines

Le farnésol libre s'incorpore, non seulement dans le cholestérol des cellules de mammifères (Fliesler et Keller, 1995; Crick *et al.*, 1995), mais aussi dans les protéines farnésylées (Crick *et al.*, 1995), en particulier dans les protéines Ras (McGuire *et al.*, 1996;



Fig. 22.37: Relations métaboliques proposées par Crick *et al.* (1997b) entre les voies de recyclage utilisant le farnésol et le géranylgéraniol et la voie de biosynthèse des isoprénoïdes classique chez les animaux ; la voie de biosynthèse des isoprénoïdes conventionnelle est en noir et les voies d'utilisation-formation des isoprénoïs sont respectivement en rouge et bleu. (HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A ; MVA, Mévalonate ; IPP, Isopentényl diphosphate ; DMAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GPP, Géranyl diphosphate ; *t*,*t*-FPP, *trans*,*trans*-Farnésyl diphosphate ; *t*,*t*-Fol, *trans*,*trans*-Farnésol ; *t*,*t*,*t*-GGPP, *trans*,*trans*-Géranylgéranyl diphosphate ; *t*,*t*,*c*-GGol, *trans*,*trans*,*cis*-Géranylgéranyl diphosphate)

Vogt *et al.*, 1996 ; Ownby et Hohl, 2002). Dans les cellules de tabac, le Fol est aussi utilisé pour la biosynthèse des stérols, des sesquiterpènes et des protéines isoprénylées (Thai *et al.*, 1999 ; Hartmann et Bach, 2001).

Le GGol exogène est aussi utilisé pour l'isoprénylation de protéines animales. Il est incorporé dans les protéines de différentes lignées cellulaires telles que les cellules UT-2, dérivées de la lignée cellulaire CHO (Crick *et al.*, 1997a), les cellules leucémiques (Ohizumi *et al.*, 1997) ou les cellules gliales C6 de rat (Crick *et al.*, 1994). Dans ce dernier type cellulaire, le GGol radiomarqué est incorporé dans un groupe de polypeptides, dont la taille est similaire à celle de petites protéines liant le GTP (19-27 kDa) ainsi que dans un polypeptide de 46 kDa (Crick *et al.*, 1994). Chez les plantes, il a été montré que la radioactivité du GGol exogène est incorporée dans les protéines de cellules de tabac *Nicotiana tabacum* KY14 (Thai *et al.*, 1999). Parmi les protéines marquées, on distingue deux groupes de polypeptides ayant une taille voisine de 15 kDa et 45 kDa (Thai *et al.*, 1999), c'est-

à-dire similaire à celles des protéines animales (Crick *et al.*,1994) ou végétales (Randall *et al.*, 1993).

c. Les isoprénols lèvent l'effet inhibiteur des statines chez les animaux

Le farnésol (Fol) et le géranylgéraniol (GGol) sont capables de réverser les effets induits par une déplétion en MVA. Ils permettent de restaurer la prolifération cellulaire bloquée par un traitement par les statines. Le GGol exogène, par exemple, rétablit la croissance de cellules gliales C6 traitées à la mévinoline (Crick *et al.*, 1998). Le Fol est capable de réverser l'inhibition de la division cellulaire induite par la mévinoline dans les cellules de tabac BY-2 (Hemmerlin et Bach, 2000). Il a été montré le Fol et le GGol restaure la synthèse d'ADN des cellules NIH3T3 et des cellules gliomales C6, le Fol n'en est pas capable. De telles observations mettent en évidence le rôle privilégié que pourraient jouer les protéines géranylgéranylées dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

En conclusion, rappelons que, dans les cellules de tabac :

(i) le Fol exogène est capable de réverser les effets inhibiteurs provoqués par une déplétion en MVA ;

- (ii) le Fol et le GGol peuvent être métabolisés en FPP et GGPP, respectivement ;
- (iii) le Fol et le GGol peuvent être utilisés pour l'isoprénylation des protéines ;

Ces trois éléments sont en faveur de l'existence, dans les cellules TBY-2, d'une voie de recyclage du Fol et du GGol, qui peuvent être utilisés en particulier pour l'isoprénylation des protéines.

d. Conditions de traitement des transformants stables

Le farnésol (Fol) et le géranylgéraniol (GGol) peuvent présenter des effets cytotoxiques à forte dose. Ainsi, le Fol inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose de différents types cellulaires animaux, en particulier, les cellules leucémiques (Rioja *et al.*, 2000) ou les cellules tumorales pancréatiques (Burke *et al.*, 1997). Le GGol, quant à lui, induit l'apoptose de différentes lignées cellulaires tumorales humaines, notamment des lignées

leucémiques et de cellules d'adénocarcinome de colon (Ohizumi *et al.*, 1995 ; Ohizumi *et al.*, 1997). Ces effets toxiques, qui dépendent de la dose administrée, ont aussi été observés chez les plantes. Il convient donc de bien choisir les concentrations à utiliser dans les expériences de réversion de l'inhibition par la FOS/MV, que nous souhaitons réaliser. Il a été montré que le traitement pendant 48 heures de cellules TBY-2 fraîchement repiquées par 25 μ M de Fol inhibe la croissance (Hemmerlin et Bach, 2000). Afin d'éviter ces effets, les essais de réversion ont été réalisés avec des doses de Fol inférieures à 25 μ M et un temps de traitement de 15 heures. De manière similaire, des concentrations inférieures à 25 μ M et un temps de traitement identique ont été utilisées dans le cas du GGol et du géraniol (Gol).

Les transformants stables ont été traités au préalable pendant 3 heures avec la MV (5 μ M), la FOS (40 μ M), la Kéto (40 μ M), la FOS/MV ou la Kéto/MV, puis mis en présence de dexaméthasone 10 μ M et de l'isoprénol (Gol, Fol ou GGol) à des concentrations comprises entre 0 et 20 μ M. Les cellules ont été observées après 15 heures.

e. Réversion de l'inhibition FOS/MV par les trois isoprénols (géraniol, farnésol et géranylgéraniol)

Dans un premier temps, seule la concentration maximale de 20 μ M en isoprénols a été utilisée. Dans un essai réalisé en parallèle, les transformants ont été mis en présence de MVA 3 mM (**Fig. 22.38-a, page 240**). Ce traitement est considéré comme un contrôle positif de l'expérience, puisqu'il réverse totalement, à cette dose, l'inhibition FOS/MV (voir ¶ **4.1-c**. et **d.**).

Dans ces conditions expérimentales, l'inhibition FOS/MV n'a pas provoqué des effets aussi importants que dans les expériences précédentes. En effet, seulement 34 % (Fig. 22.38b) des cellules présentent une localisation exclusivement nucléaire (contre 84 %, Fig. 22.28b), 60% une fluorescence qui se distribue à la fois dans le noyau et la membrane plasmique et 6 % ont une fluorescence verte exclusivement membranaire (Fig. 22.38-b). Malgré ce fait, nous pouvons quand même observer les effets liés à l'addition exogène des isoprénols. Les statistiques réalisées démontrent que le GGol a un effet important sur la localisation intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL (Fig. 22.38-b). En présence de cet isoprénol



Fig. 22.38: Essais de réversion de l'inhibition d'un traitement fosmidomycine 40 μ M (FOS 40 μ M) et mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M) par le farnésol (Fol), le géraniol (Gol), le géranylgéraniol (GGol) ou le mévalonate (MVA): conditions de traitement (**a**. ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation qui est soit, majoritaire à la membrane plasmique (MP), à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) ou exclusivement nucléaire (N) (**b**.) ; ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées ou non (contrôle) ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 200 cellules ont été observées en moyenne par échantillon (traité ou non). La distribution de la fluorescence (**c**.) dans différentes parties des cellules (ME, milieu de culture extracellulaire ; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme) ayant subit les différents traitements est déterminée grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>) (voir matériel et méthodes).

en C_{20} , la totalité des cellules observées ont une fluorescence verte associée exclusivement à la membrane plasmique (**Fig. 22.39**). Cet effet est comparable à celui du MVA 3 mM,



Fig. 22.39: Traitement des cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL à la mévinoline 5 μ M et à la fosmidomycine 40 μ M et essais de réversion de l'inhibition par différents isoprénols (Farnésol (Fol), Géraniol (Gol), géranylgéraniol (GGol)) ou par le mévalonate (MVA): photos de microscopie confocale représentatives de la distribution cellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL sous l'effet des différents traitements (objectif x63 ; la barre blanche représente 10 μ m ; DIC, contraste interférentiel différentiel de Nomarski)

lorsqu'il est mis en présence des transformants, dans les mêmes conditions (**Fig. 22.38-b** et **22.39**), ce qui suggère que le GGol est métabolisé par la cellule. De plus, le GGol réverse totalement les effets provoqués par la double inhibition FOS/MV, puisque en sa présence aucune cellule présente une localisation nucléaire de la fluorescence. Ces résultats sans équivoque contrastent avec ceux obtenus dans le cas du Fol. A concentration égale, cet isoprénol est beaucoup moins efficace. En effet, ce composé induit seulement une augmentation d'environ 10 % du nombre de cellules traitées dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL est exclusivement membranaire (contre 94 % en présence de GGol) (**Fig. 22.38-b**). Le Fol est donc, comme le GGol, métabolisé par les TBY-2. Dans les mêmes conditions, l'apport de Gol exogène ne provoque que des changements faibles de la proportion de cellules appartenant à chaque catégorie (MP, MP+N, et N) (**Fig. 22.38-b** et **22.39**). Ces variations sont faibles, donc difficiles à interpréter. Elles pourraient ne pas être significatives et résulter simplement de différences de sensibilité des cellules dans leur réponse aux inhibiteurs.

f. Variation de la concentration en isoprénols

Afin de déterminer si les effets de réversion induits par le GGol ou le Fol dépendent de la concentration, de nouvelles expériences ont été réalisées, dans les mêmes conditions. Nous avons choisi d'employer une gamme de concentrations en isoprénols allant de 5 à 20 μ M (Fig. 22.40-a, page 243). Des expériences statistiques ont été réalisées. Pour faciliter les comptages sur lame, uniquement deux critères visuels ont été retenus : l'absence de fluorescence verte dans le noyau (MP) ou sa présence (regroupe les cellules ayant une fluorescence localisée dans la membrane plasmique et le noyau (MP+N) et les cellules dans lesquelles elle est exclusivement nucléaire (N)) (Fig. 22.40-b). Ces nouveaux essais confirment que le GGol est capable de réverser totalement l'effet provoqué par la double inhibition FOS/MV, ceci, même à une dose de 5 µM (Fig. 22.40-b). Nous avons observé, sous microscope, que des doses plus faibles (2 µM) étaient encore efficaces. Dans cette expérience, l'effet du Fol est faible et dépendant de la concentration, avec un effet maximum obtenu pour une concentration de 20 μM. Le Gol, quand à lui, donne une réponse difficile à interpréter (Fig. 22.40-b). Il serait, bien entendu, intéressant d'augmenter les doses de Fol et Gol employées, afin de confirmer les résultats. Mais, dans ce cas, des effets cytotoxiques, notamment dans le cas du Fol, pourraient compliquer l'interprétation des résultats.





Fig. 22.40: Les cellules exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL sont traitées à la fosmidomycine 40 μ M (FOS 40 μ M) et à la mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M), 3 heures avant l'ajout des isoprénols (farnésol, Fol ; géraniol, GO ; géranylgéraniol, GGO) et de la dexaméthasone (DEX) dans le milieu de culture. Les cellules sont observées et comptées sous microscope, 15 heures après induction de la biosynthèse de la protéine géranylgéranylable.

a. Conditions de traitement des transformants stables (hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction)

b. Résultats statistiques

MP, pourcentage de cellules ayant une localisation exclusive à la membrane plasmique

MP+N et N, pourcentage de cellules ayant une localisation nucléaire (regroupe les cellules dans lesquelles la fluorescence verte est membranaire et nucléaire et les cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL se localise uniquement dans le noyau)

Il est important de souligner que les cellules, qui ont été traitées par les deux inhibiteurs FOS/MV, puis mises en présence d'isoprénols, ont conservé un état physiologique satisfaisant, comme l'atteste la coloration rouge des mitochondries après addition de MitoTracker[®] (**Fig. 22.39, page 241**).

Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons réalisé une expérience de réversion en remplaçant la FOS par la Kéto.

g. Réversion de l'inhibition Kéto/MV par les trois isoprénols

Les conditions de traitement sont identiques à celles des expériences précédentes (**Fig.** 22.41-a). Ces expériences confirment les résultats obtenus lors des essais de réversion de l'inhibition FOS/MV, à savoir que le MVA 3 mM et le GGol 20 µM réversent totalement



Fig. 22.41: Essais de réversion de l'inhibition kétoclomazone 40 μ M (Kéto 40 μ M) et mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M) par le farnésol (Fol), le géranol (Gol), le géranol (GGol) ou le mévalonate (MVA): conditions de traitement (**a**. ; DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la proteime GFP-DBCaM-CVIL a une localisation qui est soit majoritaire à la membrane plasmique (MP), à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) ou exclusivement nucléaire (N) (**b**.); ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées ou non (objectif x20); le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 200 cellules ont été observées en moyenne par échantillon traité ou pour le contrôle. La distribution de la fluorescence (**c**.) dans différentes parties des cellules (ME, milieu de culture extracellulaire; V, vacuole ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; Ca, cytoplasme) ayant subit les différents traitements est déterminée grâce au logiciel Imagel version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A., http://rsb.info.nh.gov/tj/ (voir matériel et méthodes) (ND, non déterminé).

l'inhibition Kéto/MV et que le Fol 20 μ M est beaucoup moins efficace (Fig. 22.41-b et 22.42). L'addition de Gol dans le milieu de culture n'a aucun effet (Fig. 22.41-b et 22.42). Si les mêmes cellules sont observées après 40 heures au lieu 18 heures, les effets des différents isoprénols sont conservés, malgré le fait que l'efficacité de la double inhibition est moins importante en raison de l'accroissement de la population cellulaire (Fig. 22.43, p age 246).



Fig. 22.42: Répartition intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL sous l'effet d'un traitement par la kétoclomazone 40 μ M (Kéto 40 μ M) et par la mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M), lorsque le milieu de culture est supplémenté en farnésol 20 μ M (Fol 20 μ M), géraniol 20 μ M (Gol 20 μ M) ou en mévalonate 3 mM (MVA 3 mM): photos de microscopie confocale (objectif x63) de cellules de tabac représentatives des cellules majoritairement observées lors de ces expériences de traitement (la barre blanche représente 10 μ m).



Fig. 22.43: Essais de réversion de l'inhibition Kéto/MV par les isoprénols (Fol, Gol et GGol) et par le MVA (Voir aussi Fig. 22.41) a. Conditions de traitement des cellules de tabac BY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL

b. Résultats statistiques

c. Répartition intracellulaire de la fluorescence dans les cellules traitées
h. Discussion des résultats

Le GGol exogène est métabolisé par les cellules de tabac. En effet, il permet de réverser totalement, et ceci, à des concentrations très faibles (5 μ M), l'ensemble des effets provoqués par le couple d'inhibiteurs FOS/MV ou Kéto/MV sur la distribution intracellulaire de la protéine GFP-DBCaM-CVIL. Dans ces conditions, où la synthèse endogène des isoprénoïdes cytoplasmiques et plastidiaux est inhibée, la fluorescence verte est exclusivement membranaire. Cette localisation indique que la protéine GFP-DBCaM-CVIL est modifiée post-traductionnellement, grâce à l'incorporation du GGol exogène et sa métabolisation endogène en GGPP. Dans la mesure où cette métabolisation du GGol en GGPP (double réaction de phosphorylation) a lieu dans le cytoplasme, cela signifie que dans ces conditions toutes les molécules de GFP-DBCaM-CVIL ont été géranylgéranylées par des molécules de GGPP qui ne proviennent ni de la voie du MEP ni de la voie du MVA (**Fig. 22.44-a, page 248**).

Nous avons vu précédemment que l'addition du GGol 20 μ M à des cellules traitées par la FOS/MV ou la Kéto/MV induit les mêmes effets que le MVA 3 mM exogène c'est-à-dire qu'ils assurent tous les deux l'isoprénylation de toutes les molécules de GFP-DBCaM-CVIL. A dose équivalente, le MVA est beaucoup moins efficace. Il est en effet le précurseur de très nombreux isoprénoïdes, alors que le GGPP dérivé du GGol exogène ne serait utilisé, dans le cytoplasme, que pour la géranylgéranylation des protéines.

Dans les mêmes conditions, le Fol exogène provoque un effet de réversion de l'inhibition beaucoup plus faible que celui obtenu avec le GGol, malgré l'emploi d'une dose plus forte (20μ M). Il a été montré que le Fol exogène peut servir à la synthèse d'isoprénoïdes dans les cellules TBY-2 (Hartmann et Bach, 2001). Métabolisé en FPP, il pourrait être utilisé pour farnésyler la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL (**Fig. 22.44-b**). Le FPP n'étant pas le substrat isoprénique préférentiel, l'effet de réversion observé avec le Fol est beaucoup plus faible que celui que observé en présence de GGol. Ainsi, la protéine géranylgéranylable GFP-DBCaM-CVIL pourrait aussi servir d'accepteur de résidus farnésyles en absence de molécules de GGPP disponibles.





Fig. 22.44: Schématisation des conclusions émises à partir des différentes expériences de réversion de l'inhibition mévinoline (MV) - fosmidomycine (FOS) réalisées. Ces expériences ont été réalisées en ajoutant dans le milieu de culture cellulaire soit du géranylgéraniol (GGol) (**a**.), du farnésol (Fol) (**b**.) ou du géraniol (Gol) (**c**.).

Les enzymes sont en bleu (HMGR, 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ; IDI, Isopentényl diphosphate isomérase ; DXS, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase ; GPS, Géranyl diphosphate synthase ; FPS, Farnésyl diphosphate synthase ; GGPS, Géranylgéranyl diphosphate synthase ; Acétyl-CoA, Acétyl-Coenzyme A ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A ; MVA, Mévalonate ; IPP, Isopentényl diphosphate ; DMAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GPP, Géranyl diphosphate ; GGPP, Géranylgéranyl diphosphate ; G3P, D-Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DXP, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate ; MEP, 2-C-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate; GFP-GG, protéine verte fluorescente géranylgéranylable)

Afin de compléter cette étude, nous avons également réalisé des essais de réversion en utilisant les mêmes isoprénols, mais dans les conditions d'une simple inhibition par la MV ou par la FOS.

i. Réversion de l'inhibition MV ou FOS par les isoprénols

Dans un premier temps, la voie cytoplasmique a été bloquée par la MV, 3 heures avant l'ajout de DEX et de chacun des isoprénol ou du MVA. Les cellules sont observées après 15 heures (**Fig. 22.45-a**). Ce type de traitement correspond à un contrôle négatif. Comme montré précédemment et dans la figure 22.45 (b), en présence de MV 5 μ M, la protéine GFP-DBCaM-CVIL reste associée exclusivement à la membrane plasmique dans la majorité des cellules. Dans ces conditions, aucun effet des isoprénols n'est attendu.



Fig. 22.45: Traitement des transformants TBY-2 exprimant la protéine GFP géranylgéranylable par la mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M) et par des alcools isopréniques (Fol, farnésol ; Gol, géraniol ; GGol, géranylgéranylgéranylo) ou par le mévalonate (MVA): conditions de traitement (**a**: DEX, dexaméthasone ; hPI, heures pré-induction ; hpI, heures post-induction) et détermination du pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation qui est soit majoritaire à la membrane plasmique (MP), à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) ou exclusivement nucléaire (N) (**b**.); ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées ; le contrôle correspond à des cellules induites mais non traitées ; 210 cellules ont été observées en moyenne par échantillon (contrôle, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, MV 5 μ M – Gol 20 μ M, UV

En effet, dans tous les cas, nous n'avons observé aucun changement statistique significatif concernant la répartition des cellules dans chacun des groupes MP et MP+N quelque soit la nature du composé exogène ajouté à l'exception du GGol (**Fig. 22.45-b**). En effet, plus de 95 % des cellules présentent une localisation majoritaire de la fluorescence à la membrane plasmique (**Fig. 22.45-b** et **Fig. 22.46**). Les 5 % restants correspondent à des



Fig. 22.46: Expériences de traitement simultané des cellules par la mévinoline 5 μ M (MV 5 μ M) et par des molécules ou dérivés isopréniques (MVA, mévalonate ; Fol, farnésol ; Gol, géraniol ; GGol, géranylgéraniol): photos de cellules de tabac BY-2 exprimant la protéine fluorescente géranylgéranylable dans différentes conditions de traitement observées en microscopie confocale (objectif x63, la barre blanche représente 10 μ m) ; ces photos sont représentatives de l'ensemble des cellules observées, d'après les statistiques réalisées (voir Fig. 22.45)

cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une distribution à la fois nucléaire (en moyenne, 66 % de la fluorescence totale) et membranaire (en moyenne, 29 % de

l'intensité de fluorescence totale) (**Fig. 22.45-b** et **c, page 249**). En présence de GGol, aucune cellule ne présente une fluorescence nucléaire (100 % des cellules font partie du groupe MP) (**Fig. 22.45-b**), ce qui indique que toutes les molécules de protéine GFP-DBCaM-CVIL sont géranylgéranylées. Dans les cellules traitées ou non par 5 μ M de MV, la présence d'un petit nombre de cellules présentant une fluorescence nucléaire confirme qu'en l'absence de GGol, les deux voies de biosynthèse ne produisent pas suffisamment de molécules de GGPP pour la géranylgéranylation de toutes les protéines acceptrices.

Dans le cas d'un traitement simple par la FOS 40 μ M (Fig. 22.47-a), 80 % des cellules présentent une fluorescence à la fois membranaire et nucléaire (MP+N), alors que cette distribution n'est présente que dans 1 % des cellules non traitées (Fig. 22.47-b). En présence de FOS et de GGol 20 μ M ou de MVA 3mM, toutes les cellules ont une fluorescence localisée exclusivement à la membrane plasmique (catégorie MP) (Fig. 22.47-b et Fig. 22.48), ce qui signifie que toutes les molécules de protéine GFP-DBCaM-CVIL ont été



Fig. 22.47: Essais de réversion de l'inhibition fosmidomycine 40 μ M (FOS 40 μ M) par le farnésol (Fol), le géranol (Gol), le géranolgéraniol (GGol) ou le mévalonate (MVA): conditions de traitement (**a**.; DEX, dexaméthasone; hPI, heures pré-induction; hpI, heures post-induction) et pourcentage de cellules dans lesquelles la protéine GFP-DBCaM-CVIL a une localisation qui est soit majoritaire à la membrane plasmique (MP), à la membrane plasmique et dans le noyau (MP+N) ou exclusivement nucléaire (N) (**b**.); ces pourcentages sont obtenus par comptage sous microscope à fluorescence des cellules traitées ou non (contrôle juste induit); 200 cellules ont été observées en moyenne par échantillon traité ou pour le contrôle.



FOS 40 μ M + Fol 20 μ M FOS 40 μ M + Gol 20 μ M FOS 40 μ M + GGol 20 μ M

Fig. 22.48: Traitement des transformants stables exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL par la fosmidomycine 40 μ M (FOS 40 μ M) et essais de réversion du traitement avec du farnésol 20 μ M (FoI 20 μ M), du géraniol 20 μ M (GoI 20 μ M), du géranylgéraniol 20 μ M (GGoI 20 μ M) ou du mévalonate 3 mM (MVA 3 mM): cellules représentatives de la répartition intracellulaire de la protéine géranylgéranylable sous l'effet des différents traitements. Les conditions de traitement sont celles décrites par la figure 22.47 ; le contrôle non traité correspond à un échantillon juste induit à la dexaméthasone 10 μ M (photos de microscopie confocale, objectif x63, la barre blanche représente 10 μ m)

géranylgéranylées. L'addition de Fol 20 µM réverse également l'inhibition de la FOS, mais avec une efficacité moins grande que celle du GGol. Dans ce cas, la proportion de cellules avec une fluorescence MP+N passe à 31 % alors qu'elle est de 80 % sous l'effet de la FOS seule (**Fig. 22.47-b** et **Fig. 22.48**). En raison de l'inhibition de la voie du MEP par la FOS, la voie qui fournit la majorité des molécules de GGPP destinées à la géranylgéranylation de la protéine GFP, on peut penser que les molécules de GFP-DBCaM-CVIL localisées dans la membrane plasmique ont servi d'accepteur pour les molécules de FPP issues de la métabolisation du Fol. Mais on ne peut pas exclure que parmi ces molécules de protéines GFP-DBCaM-CVIL, certaines soient géranylgéranylées, car la voie du MVA n'est pas inhibée et on sait qu'elle contribue aussi de façon minoritaire à la géranylgéranylation des protéines. Dans ces conditions, malgré la présence d'une quantité importante de molécules de FPP provenant de la voie endogène et du Fol exogène, la réversion de l'inhibition de la FOS par le Fol n'est pas totale. Ceci est probablement dû au fait que le FPP n'est pas le substrat préférentiel de la réaction de géranylgéranylation.

Comme dans le cas de la double inhibition FOS/MV, le Gol 20 μ M n'a pas d'effet visible (Fig. 22.47-b et Fig. 22.48).

Toutes ces données confirment les observations qui ont été obtenues suite à un double traitement FOS/MV et Kéto/MV.

5. Conclusion générale

Toutes ces données présentées montrent que le système expérimental que nous avons mis au point est fonctionnel. Il permet, en effet, de visualiser la réaction d'isoprénylation d'une protéine dans les cellules TBY-2. Nous avons obtenu deux lignées de transformants permettant d'exprimer deux protéines chimères, GFP-DBCaM-CVIL et GFP_DBCaM-CVIM, dont la séquence est identique à l'exception du dernier acide aminé en C-terminal. Dans le premier cas, cette séquence se termine par une leucine (L) ; dans le second, il s'agit d'une méthionine (M). Cette unique différence est suffisante pour permettre à chacune des protéines substrat d'être reconnue par des protéines prényl transférases distinctes, respectivement, une GGTase-I et une FTase. Lorsque ces deux protéines ont fixé soit un résidu géranylgéranyle, soit un résidu farnésyle, elles sont capables de s'associer à la membrane plasmique. Lorsque cette réaction ne peut avoir lieue, ces deux protéines s'accumulent dans le noyau. Notre système expérimental permet donc de visualiser directement l'état de prénylation des deux protéines.

La protéine GFP-DBCaM-CVIL sert d'accepteur à un résidu géranylgéranyle provenant du GGPP. Nous avons démontré que ce GGPP est synthétisé majoritairement par la voie plastidiale du MEP, mais que la voie du MVA apporte aussi une contribution (**Fig. 22.49**). La protéine GFP-DBCaM-CVIM sert d'accepteur à un résidu farnésyle provenant du



Fig. 22.49: Schématisation des conclusions réalisées à partir des expériences de blocage chimique des voies et des essais de réversion réalisés: les substrats isopréniques utilisés pour modifier une protéine géranylgéranylable (*GFP-GG*) sont d'origine majoritairement plastidiale et faiblement cytoplasmique

Les enzymes sont en bleu (HMGR, 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ; IDI, Isopentényl diphosphate isomérase ; DXS, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase ; GPS, Géranyl diphosphate synthase ; FPS, Farnésyl diphosphate synthase ; GGPS, Géranylgéranyl diphosphate synthase ; Acétyl-CoA, Acétyl-Coenzyme A ; HMG-CoA, 3hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A; MVA, Mévalonate; IPP, Isopentényl diphosphate; DMAPP, Diméthylallyl diphosphate ; GPP, Géranyl diphosphate ; FPP, Farnésyl diphosphate ; GGPP, Géranylgéranyl diphosphate ; G3P, D-Glycéraldéhyde 3-phosphate; DXP, 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate; GFP-66, protéi Reverte Daorssocet castandes sabstate) isoprénique est synthétisé uniquement par la voie du MVA. Nos résultats démontrent clairement que la localisation intracellulaire des deux protéines dépend de leur état de prénylation, qui est lui-même fonction de la disponibilité des substrats respectifs. Le système expérimental utilisé nous a donc permis de démontrer que la localisation intracellulaire d'une protéine acceptrice de groupements isoprényles, c'est-à-dire sa fonction, est régulée directement par la quantité de substrat disponible. Comme montré précédemment, la déstabilisation du cytosquelette (microtubules ou filaments d'actine) ou du système endomembranaire (par la bréfeldine A) n'a aucun effet sur la distribution intracellulaire des protéines isoprénylées. On peut donc en déduire que, dans les cellules végétales, la fonction de ces protéines dépend majoritairement du fonctionnement des deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général d'une étude de l'isoprénylation des protéines chez les plantes supérieures. Ce processus fondamental connu chez tous les eucaryotes implique l'attachement par une liaison thioéther de résidus isopréniques en C15 (farnésyle) ou C20 (géranylgéranyle) sur une ou deux cystéines appartenant à un motif de type CaaX, XCXC, XXCC, CCXX, localisé en position C-terminale de la protéine. Les protéines isoprénylées jouent un rôle important dans les voies de signalisation et de trafic vésiculaire et leurs fonctions dépendent étroitement de leur localisation cellulaire. Jusqu'à présent, les connaissances concernant ces protéines dans le règne végétal restent encore très fragmentaires.

Ce travail a été consacré à l'obtention d'un outil de travail, qui permet de visualiser, dans des cellules végétales, l'isoprénylation de protéines chimères porteuses d'un motif CaaX, pouvant servir d'accepteur à un résidu farnésyle ou bien à un résidu géranygéranyle ou bien encore à deux résidus géranylgéranyles. En effet, la fixation d'un tel résidu hydrophobe sur une protéine favorise son association avec les membranes. Si cette protéine accepteur est rendue fluorescente, par exemple, après fusion à la GFP, il devient possible de visualiser sa localisation, qui sera fonction de son état de prénylation.

Le matériel végétal utilisé consiste en des cellules de tabac BY-2, caractérisées par un cycle cellulaire court (environ 14 heures) et donc très actives métaboliquement. Dans la première partie de ce mémoire, nous avons présenté les choix qui ont été faits concernant les protéines chimères servant d'accepteurs de résidus isoprényles. Ces protéines chimères ont été construites à partir de la séquence C-terminale d'une calmoduline particulière, la calmoduline de riz (OsCaM61), constituée du domaine basique (DB) et du motif CVIL, et de la séquence complète d'une protéine Rop d'Arabidopsis thaliana (AtRop6). Ces 2 séquences protéiques ont été fusionnées en C-terminal de la GFP, de manière à conserver l'accessibilité du motif CaaX terminal. Dans le cas de la protéine CaM de riz, ce motif (CVIL) se termine par une leucine ; cette protéine peut donc servir d'accepteur à un résidu géranygéranyle. La protéine AtRop6 se termine par le motif CSIL, un motif qui favorise également une géranylgéranylation de la protéine. Dans les deux cas, une mutation de la cystéine du motif CaaX et son remplacement par une sérine permet d'empêcher la réaction de géranylgéranylation; on obtient alors une protéine non isoprénylable, qui ne présente donc pas d'affinité avec les membranes. Il est également possible de modifier l'acide aminé terminal, en remplaçant la leucine (L) par une méthionine (M), ce qui permet de convertir une protéine géranygéranylable en une protéine farnésylable.

Nous avons développé différentes lignées transgéniques de cellules de tabac BY-2, capables d'exprimer les protéines suivantes : GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-C/S, GFP-AtRop6-CSIM, GFP-AtRop6-C/S et GFP. Dans un premier temps, il a fallu optimiser les différents paramètres expérimentaux nécessaires à l'obtention de bonnes conditions d'expression et d'observation de ces protéines. Différents protocoles de transformation ont été testés. Les différentes protéines ont été exprimées soit de façon transitoire, soit de façon stable. L'obtention de lignées transgéniques stables de tabac est particulièrement intéressante. Les gènes codant les protéines d'intérêt ont été introduits dans

un vecteur et placés sous le contrôle d'un promoteur inductible par la dexaméthasone. L'expression des différentes protéines chimères peut ainsi être induite un moment déterminé par l'expérimentateur.

Les résultats obtenus démontrent clairement que dans les transformants TBY-2, les protéines GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM (farnésylables) ainsi que la protéine GFP-DBCaM-CVIL (géranylgéranylable) sont associées majoritairement à la membrane plasmique. L'inhibition de la réaction de farnésylation et de géranylgéranylation par des inhibiteurs (respectivement, le PFTI-I ou le GGTI-2133) ou par le remplacement de la cystéine du motif CaaX en sérine, induit un changement de localisation intracellulaire des protéines cibles, qui s'accumulent alors dans le noyau. Notre système expérimental permet donc de visualiser *in vivo*, par observation directe au microscope confocal, l'état de prénylation des protéines.

Dans le but de d'étudier le trafic intracellulaire de ces protéines isoprénylées, les transformants TBY-2 ont été traités avec des composés qui interfèrent avec les microtubules et les filaments d'actine du cytosquelette (cytochalasine, oryzaline et taxol) ou bien avec la voie sécrétoire (bréfeldine A). Les résultats obtenus indiquent que les protéines GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM ne sont pas transportées *via* les voies de trafic intracellulaires identifiées pour les protéines animales isoprénylées. En effet, le transport intracellulaire de ces deux protéines ne fait intervenir ni les éléments du cytosquelette, ni l'appareil de Golgi. Une observation intéressante concerne la localisation des deux protéines isoprénylées au niveau de la plaque cellulaire dans les cellules en division.

Avec ce nouvel outil expérimental, nous avons voulu déterminer l'origine biosynthétique des molécules de FPP et de GGPP, nécessaires à la réaction de farnésylation et de géranylgéranylation. En effet, les plantes supérieures possèdent deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes, la voie du MVA cytoplasmique et la voie du MEP, localisée dans le plaste. Dans ce contexte, la détermination de la contribution de chacune des voies à la synthèse des 2 types de protéines isoprénylées constituait un défi particulièrement intéressant à relever.

Dans ce but, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de chacune des voies : la mévinoline, pour inhiber la voie du MVA, et la fosmidomycine (FOS) et la kétoclomazone (Kéto), pour inhiber celle du MEP. De cette manière, il est possible de diminuer les quantités endogènes en isoprénoïdes de chaque voie ou des deux simultanément et d'étudier les conséquences de ces déplétions sur la farnésylation et la géranylgéranylation des protéines

d'intérêt. En outre, les cellules TBY-2 traitées avec ces inhibiteurs ont été mises en présence d'intermédiaires biosynthétiques comme le MVA, le farnésol (Fol) et le géranylgéraniol (GGol), dans le but de réverser les effets des inhibiteurs.

Les résultats obtenus démontrent, et ceci pour la première fois, que la voie plastidiale du MEP intervient de façon majeure dans la géranylgéranylation des protéines. En effet, en présence de fosmidomycine, qui bloque la synthèse du GGPP plastidial, la géranylgéranylation de la protéine GFP-DBCaM-CVIL est inhibée, ce qui induit une accumulation de cette protéine dans le noyau. Cependant, cette inhibition n'est pas complète, ce qui signifie que la voie du MVA participe aussi à cette réaction d'isoprénylation. L'addition de GGol exogène à des cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL et traitées à la fois par la MV et la FOS, réverse totalement les effets des inhibiteurs, et ceci, à une concentration de 5 µM. Cette expérience indique que le GGol exogène a été métabolisé dans la cellule en GGPP, utilisé ensuite pour la réaction de géranylgéranylation de cette protéine, qui retrouve sa localisation à la membrane plasmique. Les effets de la double inhibition peuvent également être réversés à 100 % en présence de MVA, ce qui confirme que la voie cytoplasmique participe à la réaction de géranylgéranylation des protéines. Dans ces conditions, le cytoplasme pourrait fournir au plaste des précurseurs, par exemple des molécules d'IPP, qui seraient métabolisées en GGPP à l'intérieur du plaste. Le GGPP formé serait ensuite exporté vers le cytoplasme où la réaction de géranylgéranylation des protéines prend place. Cependant, on ne peut exclure une synthèse directe de GGPP par la voie du MVA. En l'absence de MVA exogène, cette voie ne serait pas capable de complémenter la voie du MEP, inhibée par la FOS ou la Kéto. L'observation d'une réversion partielle d'une double inhibition MV/FOS ou MV/Kéto par le Fol exogène, dans les cellules TBY-2 exprimant la protéine GFP-DBCaM-CVIL indique que ce composé est métabolisé en FPP, puis utilisé comme substrat, à la place du GGPP, pour farnésyler cette protéine. En ce qui concerne la farnésylation des protéines GFP-DBCaM-CVIM et GFP-AtRop6-CSIM, nous avons montré que c'est uniquement la voie du MVA qui fournit le FPP nécessaire.

En résumé, nous avons obtenu deux lignées de transformants à partir de cellules TBY-2 permettant d'exprimer deux protéines chimères, GFP-DBCaM-CVIL et GFP-DBCaM-CVIM, dont la séquence est identique, exception faite du dernier résidu. Dans le premier cas, le motif CaaX se termine par une leucine et dans le second, par une méthionine. Cette unique différence est suffisante pour permettre à chacune des protéines substrat d'être reconnue par des protéines prényl transférases distinctes, respectivement, une GGTase-I et une FTase. Lorsque ces protéines ont fixé soit un résidu géranylgéranyle, soit un résidu farnésyle, elles sont capables de s'associer à la membrane plasmique. Lorsque cette réaction ne peut avoir lieu, ces deux protéines s'accumulent dans le noyau. Notre système expérimental permet donc de visualiser *in vivo*, directement sous le microscope confocal, l'état de prénylation des deux protéines. Nous avons montré que la localisation intracellulaire d'une protéine acceptrice de groupements prényles, c'est-à-dire sa fonction, est régulée par la disponibilité des substrats isopréniques, donc par le fonctionnement des deux voies de biosynthèse, mais aussi par l'activité des protéines prényl transférases.

L'outil biologique que nous avons construit apparaît comme particulièrement prometteur pour mesurer des flux biosynthétiques, pour mettre en évidence *in vivo* les effets toxiques d'inhibiteurs spécifiques, ou pour tester de nouveaux herbicides et drogues, susceptibles d'interagir avec la voie du MEP ou la géranylgéranylation des protéines.

Matériel et Méthodes

La première partie de ce chapitre traite du matériel utilisé, et la seconde, des méthodes biochimiques et de biologie moléculaire et cellulaire employées au cours de ce travail de thèse.

Partie 1 : LE MATERIEL

1. Le matériel vivant

1.1 Le matériel végétal : conditions de culture

a. Les cellules de tabac

La lignée de cellules de tabac *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 (TBY-2) isolée initialement par Kato et coll. (1972) nous a été fournie par le Professeur Toshiyuki Nagata (Université de Tokyo, Japon). Elle est issue de cals induits à partir de jeunes plants selon Nagata et coll. (1992). Elle est repiquée tous les 7 jours : 2 ml de cellules en phase stationnaire de croissance sont transférés dans 80 ml de milieu Murashige et Skoog (MS) supplémenté frais (**Fig.** MM.1, **page 263**) (dilution de 1:40). Le milieu Murashige et Skoog (1962) vient de chez Duchefa (Harlem, Pays Bas). Les cellules sont cultivées sous agitation continue (154 RPM, agitateur New Brunswick Scientific, Edison, NJ, Etats-Unis), à une température ambiante de 27°C et à l'obscurité.

Les lignées TBY-2 transformées stablement par agroinfection sont cultivées de la même manière mais dans du milieu MS supplémenté, additionné d'antibiotique(s) (carbénicilline et hygromycine, voir ¶ 2.1. et Fig. MM.3).

b. Le tissu épidermique de poireau et d'oignon

Le poireau (*Allium porrum* L.) et les bulbes d'oignon (*Allium cepa* L.) sont issus du marché local. Le tissu épidermique de poireau utilisé est prélevé à l'aide d'une pince sur la partie interne de la base des feuilles charnues. Le tissu épidermique d'oignon est prélevé de la même façon à partir de la partie interne des couches composant les bulbes d'oignon. Ils sont placés sur milieu MS supplémenté solide (0,5% d'agar) (**Fig.** MM.1) ; les boîtes sont laissées à l'obscurité à 26°C.

Mili	ieu MS (Duchefa, Harlem, Pays Bas):	•	en mg/l
Mic	ro-éléments:		
•	CoCl ₂ .6H ₂ O	•	0.025
•	CuSO ₄ .5H ₂ O	•	0.025
•	FeNaEDTA	•	36.7
•	H ₃ BO ₃	•	6.2
•	KI	•	0.83
•	MnSO ₄ .H ₂ O	•	16.9
•	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	•	0.25
•	ZnSO ₄ .7H ₂ O	•	8.6
Ма	cro-éléments:		
•	CaCl ₂	•	332.02
•	KH ₂ PO ₄	•	170
•	KNO ₃	•	1900
•	MgSO₄	•	180.54
•	NH ₄ NO ₃	•	1650
Vita	amines:		2
•	Glycine	•	2
•	Myo-inositol	•	100
•	Acide nicotinique	•	0.5
•	Pyridoxine HCI	•	0.5
•	Thiamine HCI	•	0.1
Sup	pléments:	•	510000
•	KH ₂ PO ₄		0.2
•	2.4-D		100
•	Myo-inositol	•	1
•	Thiamine	•	30000
•	Saccharose		00000
•	(Agar 0,5%-1%)	•	5000
•	Ajuster à pH 5.8 (KOH 1 M)		0000

Fig. MM.1: Composition du milieu Murashige et Skoog (MS) supplémenté utilisé pour la culture des cellules et tissus végétaux. Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 1 bar pendant 20 min.

c. Les plantules de riz : conditions de croissance

Les grains de riz (*Oryza sativa* L.) proviennent du Jardin Botanique de Strasbourg. Ils sont laissés en présence d'eau distillée stérile pendant 30 min. avant d'être mis à germer dans une atmosphère humide, sur du papier filtre (type papier Whatman[®] 3MM) imbibé d'eau distillée. Les boîtes sont placées à 22°C sous humidité et lumière constantes. Au bout de 4 jours, les plantules de riz sont utilisées pour en extraire les ARNs en vue de l'isolement de la partie C-terminale d'intérêt de la calmoduline 61 de riz.

d. Les cellules de ronce

La culture est entretenue dans notre département par Annie Hoeft. Elle a été employée dans des essais d'utilisation du marqueur MitoTracker.

1.2 Le matériel bactérien : conditions de culture

a. Les bactéries de type XL1-blue

La souche *Escherichia coli* XL1-blue est utilisée comme souche de propagation des plasmides d'intérêt. Le génotype de ces bactéries est le suivant : recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB, $laci^{q}Z\Delta M15$, $Tn10(tet^{R})$]. Elles sont cultivées à 37°C, dans du milieu Luria-Bertani (LB ; composition : voir **Fig.** MM.2, **page 265**) stérile, solide ou liquide (agitation constante 190 RPM (agitateur rotatif GFL 3015, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Allemagne)) supplémenté d'antibiotique(s) (¶ 2.2.).

b. Les agrobactéries LBA 4404

Les agrobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*), phytopathogènes du sol, présentent la particularité de pouvoir transformer génétiquement les cellules végétales cibles (Escobar et Dandekar, 2003 ; Sheng et Citovsky, 1996 ; pour revue, Zupan *et al.*, 2000). Elles sont en effet capables de transférer naturellement une partie de l'ADN ou ADN-T, situé entre les frontières répétées droite (RB, « right T-DNA border ») et gauche (LB, «left T-DNA border ») dans le génome des cellules végétales par recombinaison illégitime.

La souche LBA 4404 (Numéro d'accès auprès de la collection « The Netherlands culture collection of bacteria » (NCCB) (<u>http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm</u>): 2760) est utilisée pour agroinfecter les cellules de tabac BY-2. Elle possède un plasmide Ti (« tumor inducing ») pAL4404 délété de ses gènes oncogènes. Celui-ci comprend uniquement les gènes de virulence *vir* dont les produits sont responsables de l'intégration de l'ADN-T dans le génome végétal (Oom *et al.*, 1981 ; Hoekema *et al.*, 1983).

Ces bactéries poussent à 25°C, dans du milieu « yeast extract broth » (YEB) stérile (Fig. MM.2), solide ou liquide (sous agitation rotative continue, 40 tours par minutes). Le milieu

YEB est supplémenté en magnésium ainsi qu'en sucres qui permettent d'augmenter l'expression des gènes *vir* (en présence d'acétosyringone 200 μ M final, Shimoda *et al.*, 1990). Des antibiotiques sont rajoutés dans le milieu de culture, la souche LBA 4404 étant résistante à la rifampicine (marqueur chromosomique) et à la streptomycine (gène marqueur du plasmide Ti) (voir ¶ 2.2.).

۵.	Milieu Luria Bertani (LB) pour bactérie:	•	en g/l
	 Bacto[®]-Tryptone Extrait de levure (Bacto[®]-Yeast Extract) NaCl (Pastagar B 1,5%) Eau distillée qsp Ajuster à pH 7 avec du NaOH et stériliser par autoclavage (1 bar, 20 min) 	• • •	10 5 10 (15)
b.	Milieu Yeast Extract Broth (YEB) pour agrobactérie:	•	en g/l

		en g/i
Extrait de bœuf (Gibco-Beef extract)	•	5
Extrait de levure (Bacto [®] -Yeast Extract)	•	1
Bacto-peptone	•	1
(BactoAgar 1,5%)	•	15
Eau distillée qsp		
Ajuster à pH 7,4		
Sont ajoutées, après autoclavage de ce milieu (1 bar, 20 min), les solutions suivantes stérilisées par filtration (l'autoclavage peut dégrader les sucres):		
Saccharose 20%		
• MgSO ₄ (1 M)		

Fig. MM.2: Composition des milieux utilisés pour la culture des bactéries **a.** Milieu utilisé pour la culture des bactéries *Escherichia coli*

b. Milieu de culture des agrobactéries *Agrobacterium tumefaciens*

2. Les antibiotiques

Les milieux de culture de plante ou de bactéries peuvent être complétés par un ou deux antibiotiques. Tous ces antibiotiques ont pour spectre antimicrobien les bactéries Gramnégatives et Gram-positives et sont préparés et utilisés selon la figure MM.**3**.

Nom de l'antibiotique Abréviation Masse Moléculaire	Solvant	Solution stock	Conservation	Concentration finale
Carbénicilline Carb MM= 422,4 g/mol	Eau distillée	500 mg/ml	-20°C	500 μg/ml
Hygromycine B Hyg MM= 527.52 g/mol	Eau distillée	1130 mg/ml	4°C	113 μg/ml
Ampicilline Amp MM= 349.40 g/mol	Eau distillée	100 mg/ml	-20°C	100 μg/ml
<mark>Kanamycine</mark> Kan MM= 581.59 g/mol	Eau distillée	30 mg/ml	-20°C	30 µg/ml
Streptomycine Strepto MM= 1457.38 g/mol	Eau distillée	50 mg/ml	-20°C	50 μg/ml
Tétracycline Tet MM= 444,4 g/mol	EtOH	12,5 mg/ml	-20°C	12,5 μg/ml

Fig. MM.3: Antibiotiques utilisés dans la préparation de milieux de culture

Le milieu de culture de plantes peut être supplémenté en carbénicilline ou hygromycine B. Les milieux de culture bactériens peuvent être complétés par l'ajout des antibiotiques suivants: ampicilline, kanamycine, streptomycine, tétracycline. Tous ces antibiotiques (à l'exception de l'hygromycine B vendue en solution stérile) sont préparés dans le solvant adéquat et stérilisés par filtration

(EtOH, éthanol)

2.1 Milieux de culture de plante

La **carbénicilline** (α -Carboxybenzylpenicillin disodium salt) (Duchefa) est une carboxypénicilline analogue de l'ampicilline qui agit sur la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne. Elle est utilisée comme agent anti-agrobactérien dans le milieu de culture cellulaire végétal le mois suivant la transformation.

L'**hygromycine B** (Duchefa) agit en bloquant la synthèse du polypeptide et en inhibant son élongation. Elle est utilisée, dans le milieu MS, pour sélectionner les lignées TBY-2 agroinfectées ayant intégré l'ADN-T (gène de résistance) dans leur génome et maintenir cette culture cellulaire.

2.2 Milieux de culture pour bactéries

L'**ampicilline** (D-(-)- α -Aminobenzylpenicillin) (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Etats-Unis) est un antibiotique dérivé de la pénicilline qui inhibe la synthèse de la paroi bactérienne en inactivant les transpeptidases de la surface interne de la membrane cellulaire. Les bactéries résistantes possèdent le gène codant pour une β -lactamase qui dégrade l'ampicilline en clivant sa structure β -lactam. Elle est utilisée dans le milieu de croissance LB afin de sélectionner les bactéries transformées avec le vecteur pGEM[®]-T (¶ 3.1.) ou pGFP-MRC (¶ 3.2.), porteurs d'un gène de résistance. Ce gène (*Amp^R*) code l'enzyme β -lactamase.

La **kanamycine B** (Bekanamycin sulfate salt) (Sigma) est une molécule qui agit en se fixant sur la sous-unité ribosomique 70S et entraîne une inhibition de la translocation. Elle est utilisée, dans le milieu LB ou YEB, pour sélectionner les *E. coli* ou agrobactéries, transformées avec le vecteur pTA 7001, porteur d'un gène de résistance à cet antibiotique. Ce gène (Kan^R) code pour une enzyme (aminoglycoside phosphotransferase) qui inhibe l'action de l'antibiotique.

La **streptomycine** (Streptomycin sulfate salt) (Sigma) se lie sur la sous-unité ribosomique 30S et provoque des erreurs de lecture. Les bactéries résistantes possèdent une mutation dans le gène *rpsL* codant pour la protéine ribosomale S12 qui empêche la fixation de la streptomycine sur le ribosome. La streptomycine est utilisée dans le milieu de culture YEB pour sélectionner les agrobactéries LBA 4404.

La tétracycline (Sigma) agit en empêchant la fixation de l'aminoacyl-tRNA sur la sous-unité ribosomique 30S. Cet antibiotique est utilisé dans le milieu LB pour sélectionner spécifiquement les bactéries XL1-blue en culture qui sont résistantes à cet antibiotique grâce au gène *tet*. Il code pour une protéine qui modifie la paroi bactérienne qui perd sa perméabilité. Le transport de l'antibiotique dans la cellule n'a plus lieu.

3. Le matériel génétique

3.1 Vecteur de clonage : pGEM[®]-T

Le vecteur pGEM[®]-T (Promega, Manuel technique No. 42) est commercialisé par Promega (Madison, Wisconsin, Etats-Unis). C'est un vecteur de type « high copy », qui possède un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R), un gène lacZ codant pour une β -galactosidase interrompu par deux promoteurs, T7 et SP6, et par une région formée de différents sites de restrictions (carte : **Fig.** MM.4). pGEM[®]-T est utilisé pour cloner les fragments amplifiés par



Fig. MM.4: Carte circulaire du vecteur de clonage pGEM®-T

PCR. L'amplification par des polymérases thermostables générant une déoxyadénosine (A) à chaque extrémité 3', facilite le clonage de ces fragments entre les déoxythymidines (T) des deux extrémités 3' du vecteur. Ces deux bases T sortantes augmentent l'efficacité de ligation en évitant la recircularisation du vecteur. Les clones, poussant sur milieu LB ampicilline solide (100 μ g/ml final) supplémenté en IPTG (100 μ l d'IPTG 100 mM étalé par boîte) et X-Gal (20 μ l de X-Gal 50 mg/ml étalé par boîte), et possédant un vecteur pGEM[®]-T recircularisé par un insert, sont identifiables de part leur couleur. Le clonage d'un insert interrompt la séquence codante de la β -galactosidase et les clones recombinants peuvent donc être identifiés de part leur couleur blanche.

3.2 Vecteur de sous clonage et d'expression transitoire : pGFP-MRC

Le vecteur pGFP-MRC a été fourni par le Docteur Manuel Rodríguez-Concepción (Université de Barcelone, Barcelona, Espagne) (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). C'est un vecteur binaire de type « high copy » qui possède un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) (**Fig.** MM.**5-a**, page 270). Il contient un insert qui code pour une protéine verte fluorescente (GFP, « Green Fluorescent Protein ») de synthèse (sGFP, « synthetic Green Fluorescent Protein »). Il s'agit d'une protéine optimisée pour transformer des cellules végétales (Chiu *et al.*, 1996). La séquence de la GFP est placée sous le contrôle d'un double promoteur fort constitutif *35SC4PPDK* et d'un terminateur 3'*NOS* (Chiu *et al.*, 1996 ; Sheen, 1993 ; Sheen *et al.*, 1995). Elle est excitée dans le bleu à un maximum de 488 nm et émet dans le spectre de la lumière verte à un maximum de 511 nm (**Fig.** MM.**11**).

Le vecteur pGFP-MRC est utilisé dans le but de sous cloner les séquences d'intérêt en Cterminal de la GFP (les sites de clonage utilisés sont *SacI* et *XbaI* ou *SacI* et *SalI*). Il permet d'exprimer les protéines de fusion transitoirement dans un matériel végétal choisi.

3.3 Vecteur de sous clonage et d'expression stable : pTA 7001

Nous remercions le Professeur N.-H. Chua (The Rockfeller University, New York, Etats-Unis) pour nous avoir fournit le vecteur pTA 7001 (Aoyama et Chua, 1997) (**Fig. MM.5-b**, **page 270**). C'est un vecteur binaire, de type « low copy », sélectionné grâce à une résistance à la kanamycine. Il contient un ADN-T formé de trois éléments :

- un gène de résistance à l'hygromycine B (HPT)

- un élément de clonage (formé d'un promoteur inductible à la dexaméthasone (6xUAS_{GAL4})
 suivi de deux sites *Spe*I et *Xho*I permettant le clonage du gène d'intérêt, et d'un terminateur
 T3A)
- un gène GVG code pour un facteur de transcription qui est formé de trois parties : un domaine de fixation à l'ADN, un domaine d'activation de la transcription du gène étudié et un domaine récepteur de l'hormone glucocorticoïde



Fig. MM.**5**: Carte des vecteurs de sous clonage et d'expression des protéines d'intérêt dans les cellules végétales **a**. Carte du vecteur binaire pGFP-MRC (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999): il a une taille égale à 4696 pb et possède un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection de ce vecteur. La séquence qui code pour la protéine GFP synthétique (sGFP) est située entre un double promoteur 35S et un terminateur de type NOS. Elle est suivie d'une région de clonage multiple, sites de restrictions qui seront utilisés afin de cloner les séquence nucléotidiques d'intérêt.

(pb, paire de base ; P 2x35SC4PPDK, double promoteur 35S ; ATG, codon « start » ; sGFP, « synthetic Green Fluorescent Protein» ; TAG, codon stop ; 3' MCS, « 3' Multiple Cloning Site » ; T3'NOS, terminateur ; Amp^R , gène de résistance à l'ampicilline ; ORI, origine de réplication)

.b. Carte du vecteur binaire pTA 7001 (Aoyama et Chua, 1997): formé de 12713 pb, ce vecteur possède un gène de résistance à la kanamycine ainsi qu'un ADN de transfert (ADN-T)

(pb, paire de base ; RB, « right T-DNA border » ; 35S, promoteur 35S ; GVG, protéine tripartite « GAL4 DNA binding domain », « VP16 transactivating domain », « GR receptor domain » ; TE9, terminateur de pois rbcs-E9 ; PNOS, promoteur NOS ; HPT, hygromycine phosphotransférase ; TNOS, terminateur NOS ; T3A, terminateur de pois rbcs-3A ; SC, sites de clonage ; $P6xUAS_{ard4}$, promoteur 6xUAS_{en14}; LB, « left T-DNA border » ; Kan^R , gène de résistance à la kanamycine ; ORI, origine de

 $PoxUAS_{gal4}$, promoteur $6xUAS_{gal4}$; LB, « left 1-DNA border »; Kan^n , gene de resistance à la kanamycine ; ORI, origine de réplication)

Le vecteur pTA 7001 est utilisé pour cloner les séquences des protéines de fusion GFP d'intérêt et les exprimer stablement sous la dépendance de la dexaméthasone (principe de l'induction de l'expression protéique, voir chapitre I) dans les cellules de tabac BY-2 après agroinfection.

3.4 Les oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés par Sigma-Genosys (Cambridge, Royaume-Uni) ou Gibco-BRL[®]-Invitrogen (Carlsbad, California, Etats-Unis) (Liste des oligonucléotides et leur utilisation en **Annexe 3**). Ils sont dilués dans du tampon $T_{10}E_1$ pH8 (0,5% de Tris 2 M ; 0,2% de EDTA 0,5 M ; 99,3% d'eau distillée) pour obtenir une solution stock à 20 pmoles/µl utilisée pour les réactions de PCR. Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont préparés en solution diluée à 1 pmole/µl. Ils sont conservés à -20°C.

3.5 Banque d'ADNc d'Arabidopsis thaliana

Elle a été réalisée au laboratoire par Andréa Hemmerlin et Eléonore Guilley et a été utilisée dans le but d'isoler la séquence génétique de la protéine la Rop6 d'*Arabidopsis*.

4. Les outils moléculaires

Les endonucléases de restriction proviennent de chez Biolab (Australie) ou Gibco-BRL[®]-Invitrogen (Carlsbad, California, Etats-Unis).

La transcriptase réverse /Taq ADN polymérase Superscript[™] II est commercialisée par Hoffman-LaRoche (Basel, Suisse).

La **T4 ADN ligase** provient de chez Gibco-BRL[®]-Invitrogen (Carlsbad, California, Etats-Unis).

Ces enzymes sont toutes conservées à -20°C.

Les ADN polymérases :

- la DyNAzyme[™] (New England Biolabs, Beverly, MA, Etats-Unis) est une polymérase à ADN provenant de *Thermus brockianus*. Elle est stockée à -20°C.

- le mélange High fidelity polymerase (Hifi) (Roche, Basel, Suisse) est composé de deux enzymes thermostables, une ADN polymérase *Taq*, de la bactérie thermophile *Thermus*

aquaticus, et une *Tgo* polymérase à ADN de *Thermococcus gorgonarius* (Hopfner *et al.*, 1999). Il contient aussi le tampon réactionnel et les nucléotides. Il est stocké à 4°C.

5. Le matériel chimique

5.1 Composé radioactif

Le RS-[2-¹⁴C]-acide mévalonique (MVA^{*}) est commercialisé sous forme lactone par Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, Etats-Unis). Il a une activité spécifique de 59 mCi/mmol. Ce précurseur chaud a été mis en présence des cellules TBY-2 dans le but de révéler des protéines l'ayant incorporé.

5.2 La dexaméthasone

La **dexaméthasone** (DEX) (prednisolone, 9α -Fluoro-16 α -méthyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4pregnadiène-3,20-dione) (Sigma) est un agent glucocorticoïde anti-inflammatoire. Elle a été utilisée dans le but de provoquer l'expression d'un gène étudié placé sous le contrôle du promoteur 6xUAS_{GAL4} (inductible par cette hormone). Elle est solubilisée dans le DMSO 100% (ou l'éthanol absolu) à une concentration stock de 3 mM et 30 mM. Ces solutions sont aliquotées par petites quantités, cette hormone étant peu stable, avant d'être stockées à -20°C. Elle sera diluée directement dans le milieu de culture des cellules de tabac BY-2 transformées stablement avec le vecteur pTA 7001, pour obtenir une concentration finale de 1, 3, 10 ou 30 μ M (**Fig.** MM.6).

α.	Nom de l'inducteur Abréviation utilisée Masse Moléculaire	Solvant	Concentration de la solution stock	Stockage	Volume mis en présence de 3ml de milieu de culture des transformants	Concentration finale dans le milieu de culture
	Dexaméthasone	DMSO	3 mM	-20°C	1 µl	1 μM
	DEX	(EtOH)			3 µl	3 μM
	MM= 392,5 g/mol		30 mM		1 µl	10 µM
					3 µl	30 µM

b.



b. Structure moléculaire de la dexaméthasone ($C_{22}H_{29}FO_5$)

5.3 Les inhibiteurs des voies de biosynthèse des isoprénoïdes

Ils ont été utilisés dans le but d'inhiber *in vivo* la voie de biosynthèse des isoprénoïdes cytoplasmiques et/ou plastidiaux des cellules TBY-2 transformées stablement avec un vecteur pTA 7001 contenant les gènes codant pour des protéines fluorescentes isoprénylables.

La mévinoline (MV) (lovastatine, acide 2-Méthyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-diméthyl-8-[2-(tétrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl)éthyl]-1-naphtalényl ester butanoique) provient des Docteurs A.W. Alberts, M.D. Greenspan et S.B. Singh (Merck Sharp and Dohme, Research Laboratories, Rahway, New Jersey, Etats-Unis). Isolée à partir de l'ascomycète *Aspergillus terreus* (Alberts *et al.*, 1980), ce métabolite est un inhibiteur de la 3-hydroxy-3méthylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGR) (Bach et Lichtenthaler, 1982), enzyme située en amont de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes cytoplasmiques.

Fig. MM.6: La dexaméthasone (DEX)

a. Conditions de préparation et d'utilisation

La solution stock est préparée selon Kita *et al.* (1980). 30 mg de mévinoline sont dissolus dans 600 μ l d'éthanol absolu à 55°C. Sont ensuite ajoutés, 6 ml d'eau distillée stérile et 300 μ l de NaOH 0,6 M. Après 30 minutes à température ambiante pendant lesquelles la forme lactone inactive est convertie en forme acide soluble, on ajuste le pH à 8 avec une solution de NaHCO₃ (0,1 N). La solution stock à 10⁻² M (4 mg/ml) est aliquotée et conservée à -20°C. Le pH de la solution stock est mesuré et ajusté à 8 avec une solution de NaHCO₃ 0,1N avant chaque utilisation. L'activité de cet inhibiteur est testée en traitant avec 5 μ M de MV une culture de cellules de tabac fraîchement repiquée dans les conditions standard. Si la MV est active, un retard de croissance est alors observé au bout de 7 jours pour les cellules traitées par rapport à un contrôle non traité cultivé dans les mêmes conditions.

La **squalestatine-1** (SQ) (acide zaragozique A) a été fournie par Laurent Wentzinger et provient des laboratoires Glaxo (Greenford, Middlesex, Royaume-Uni). C'est un inhibiteur de la squalène synthase (SQS), première enzyme spécifique de la biosynthèse des stérols (Procopiou *et al.*, 1994 ; Thelin *et al.*, 1994).

La **fosmidomycine** (FOS) (acide 3-(*N*-formyl-*N*-hydroxyamido)propylphosphonique) est un composé produit par *Streptomyces lavendulae* (Okuhara *et al.*, 1980) ayant des propriétés antibactériennes, antimalaria et herbicide. Il a été fourni par le Docteur Robert J. Eilers (Monsanto, St. Louis, MO, Etats-Unis). Il bloque une des premières étapes de la voie du MEP en inhibant la 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) bactérienne (Kuzuyama *et al.*, 1998), de *Plasmodium falciparum* (Jomaa *et al.*, 1999), ou de plante (Schwender *et al.*, 1999).

La **5-kétoclomazone** (Kétoclomazone ou Kéto) est un dérivé de l'herbicide clomazone (2-(2chlorophényl)-méthyl-4,4-diméthyl-3-isoxazolidinone) (ElNaggar *et al.*, 1992). La Kéto qui nous a été fournie par le Dr. Klaus Grossmann (B.A.S.F. Agricultural Research Center, Limburgerhof, Allemagne), inhiberait l'enzyme 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) de *Chlamydomonas* (Müller *et al.*, 2000 ; Müller, 2003).

La Figure MM.7 récapitule l'ensemble des données relatives à la préparation de ces inhibiteurs.

Nom de l'inhibiteur Abréviation utilisée Masse moléculaire	Solvant	Concentration du stock	Volume mis dans 3ml de culture cellulaire	Concentration finale
Mévinoline	H ₂ O (88%)	10 ⁻² M	1,5 µl	5 μΜ
MV	EtOH (8%)	(4 mg/ml)	3 µl	10 µM
MM= 422,56 g/mol	NaOH (4%)			50 µM
Squalestatine-1 SQ MM= 804,99 g/mol	Tris-HCl 0,1 M pH 7,4	1 mM	1,5 μl	0,5 μM
Fosmidomycine	KxPO ₄	100 mM	0,3 μl	10 µM
FOS			1,2 μl	40 µM
			1,5 µl	50 µM
5-Kétoclomazone	EtOH	1 M	3 μl	5 μM
Kéto	Eau	5 mM	0,3 µl	10 µM
		100 mM	1,2 μl	40 µM

Les inhibiteurs sont stérilisés par filtration avant d'être stockés à -20°C



Fig. MM.7: Les inhibiteurs des voies de biosynthèse utilisés (la mévinoline, la squalestatine-1, la fosmidomycine) et supposés (la 5-kétoclomazone)

a. Conditions de préparation et d'utilisation

b. Structure de la mévinoline, la fosmidomycine et la 5-kétoclomazone, principaux inhibiteurs utilisés dans ce travail

5.4 Les inhibiteurs d'isoprényl transférases

۵.

Ces inhibiteurs d'isoprényl transférases ont été testés *in vivo* sur des cellules TBY-2 transgéniques exprimant différentes protéines de fusions GFP, farnésylables ou géranylgéranylables.

Le **GGTI-2133** (4-[[N-(Imidazol-4-yl)méthylèneamino]-2-(1-naphthyl)benzoyl]leucine) (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) est un inhibiteur peptidomimétique potentiel et sélectif de la protéine GGTase-I animale (IC₅₀=38 nM) (Vasudevan *et al.*, 1999). Ce composé pénètre dans la cellule. Il a été utilisé *in vivo* en tant qu'inhibiteur potentiel de la géranylgéranylation d'une protéine GFP géranylgéranylable.

Le **FTase inhibiteur I** (FTase-I) (N-[2(S)-[2(R)-Amino-3-mercaptopropylamino]-3méthylbutyl]-Phe-Met-OH) (Calbiochem) est un composé peptidomimétique qui inhibe *in vivo* la farnésylation de protéines animales (IC₅₀ (FTase)=21 nM *in vitro*) (Cox *et al.*, 1994 ; Garcia *et al.*, 1993). Il a été utilisé dans ce travail, en tant qu'inhibiteur de la farnésylation de protéines de fusions GFP isoprénylables exprimées dans les cellules TBY-2.

Le **PFT inhibiteur I** (PFTI-I) (Acide (E,E)-2-[(Dihydroxyphosphinyl)méthyl]-3-oxo-3-[(3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatriényl)-amino]propanoïque, 3Na) (Calbiochem) est un inhibiteur de la farnésyl transférase animale (IC_{50} =83 nM) (Patel *et al.*, 1995).

Les données relatives à la préparation des inhibiteurs sont résumées dans la Figure MM.8 (page 277).

α.	Nom de l'inhibiteur Abréviation utilisée Masse moléculaire Densité	Solvant	Concentration de la solution stock	Stockage	Volume mis dans 3ml de milieu de culture cellulaire	Concentration finale
	GGTI-2133 MM= 456,5 g/mol	DMSO	60 mM	-20°C	0,5 μl 2 μl	10 μM 40 μM
	FTase inhibiteur I FTase-I MM= 470,7 g/mol	H ₂ O	60 mM	-20°C	0,5 μl 2 μl	10 μM 40 μM
	PFT inhibiteur I PFTI-I MM= 467,4 g/mol	H ₂ O	60 mM	-20°C	0,5 μl 2 μl	10 μM 40 μM

b.







Fig. MM.8: Composés agissant sur l'isoprénylation testés *in vivo* sur des cellules de tabac BY-2 exprimant différentes protéines de fusion GFP isoprénylables

a. Conditions d'utilisation des inhibiteurs suivants: GGTI-2133, FTase inhibiteur I et PFT inhibiteur I

b. Structure chimique du GGTI-2133 et du FPT inhibiteur I

5.5 Le mévalonate et les isoprénols

Le MVA, intermédiaire de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes cytoplasmiques, et les isoprénols tels que, le farnésol, le géraniol ou le géranylgéraniol ont été incorporés dans le milieu de culture cellulaire dans des expériences de réversion de l'effet inhibiteur d'un ou deux composés (mévinoline, fosmidomycine) agissant sur une voie de biosynthèse des isoprénoïdes.

Le **mévalonate** (MVA) ((\pm)-mévalonolactone, acide mévalonique) est vendu sous forme lactone (Sigma). Il est préparé de la même manière que la mévinoline. Le pH de la solution stock est vérifié avant chaque utilisation et ajusté à 8, si besoin, est à l'aide d'une solution de NaHCO₃ (0,1N). Il a été montré que seule la forme acide du mévalonate permet une réversion de l'inhibition provoquée par la mévinoline (Hemmerlin, 1997).

Le *trans*-géraniol (*t*-géraniol, Gol) (Aldrich) (*trans*-3,7-Diméthyl-2,6-octadien-1-ol) est un dérivé du géranyl diphosphate (GPP).

Le *trans,trans*-farnésol (*t,t*-farnésol, Fol) (Aldrich) (*trans,trans*-3,7,11-Triméthyl-2,6,10dodécatrien-1-ol), est un sesquiterpène alcool trouvé dans de nombreuses huiles essentielles. C'est un dérivé alcool de la molécule de farnésyl diphosphate (FPP), précurseur de nombreuses classes de terpénoïdes, utilisé comme substrat de la réaction de farnésylation.

Le *trans,trans,trans-*géranylgéraniol (*t,t,t-*géranylgéraniol, GGol) (Sigma) (*all trans-*3,7,11-15-Tétraméthyl-2,6,10,14-hexadécatétraen-1-ol) est un dérivé alcool du géranylgéranyl diphosphate (GGPP), molécule substrat de la géranylgéranylation.

Les données relatives à l'utilisation de ces composés sont regroupées dans le tableau de la **Figure MM.9-a (page 279),** leur structure chimique est schématisée au point MM.9-b.

4	^	
	_	

Nom de l'intermédiaire biosynthétique ou isoprénol Abréviation Masse moléculaire Densité	Solvant	Concentration de la solution stock	Stockage	Volume mis dans 3ml de culture cellulaire	Concentration finale utilisée
Mévalonate	H ₂ O (88%)	3,7 M	-20°C	0,4 µl	0,5 mM
MVA	EtOH (8%)			0,8 µl	1 mM
MM= 130,1 g/mol	NaOH (4%)			1,6 µl	2 mM
				2,4 μl	3 mM
				3,2 μl	4 mM
				4,1 μl	5 mM
				4,9 µl	6 mM
t-Géraniol	EtOH	30 mM	-20°C	0,5 µl	5 μΜ
Gol ou t-Gol				1 µl	10 µM
MM= 154,3 g/mol		60 mM	-20°C	0,75 µl	15 μM
d= 0,88 g/ml				1 µl	20 µM
t,t-Farnésol	EtOH	30 mM	-20°C	0,5 µl	5 μΜ
Fol ou t,t-Fol				1 µl	10 µM
MM= 222,4 g/mol		60 mM	-20°C	0,75 µl	15 μM
d= 0,879 g/ml				1 µl	20 µM
t,t,t-Géranylgéraniol	EtOH	30 mM	-20°C	0,5 μl	5 μΜ
GGol ou t,t,t-GGol				1 µl	10 µM
MM= 290,5 g/mol		60 mM	-20°C	0,75 µl	15 μM
d= 0,89 g/ml				1 µl	20 µM



Fig. MM.9: Intermédiaire biosynthétique (mévalonate) et isoprénols (*t*-géraniol, *t*,*t*-farnésol et *t*,*t*,*t*,-géranylgéraniol) utilisés

 $\boldsymbol{a}. \ Conditions \ d'utilisation$

b. Structure chimique du mévalonate (MVA), du *t*-géraniol (Gol), du *t*,*t*-farnésol (Fol) et du *t*,*t*,*t*-géranylgéraniol (GGol)

5.6 Les autres inhibiteurs

La **cafféine** (CAF) (1,3,7-Triméthylxanthine) (Sigma) a été utilisée pour son effet d'inhibiteur de la plaque cellulaire en formation au moment de la cytocinèse chez les plantes (Samuels et Staehelin, 1996).

La **bréfeldine** A (BFA) (ascotoxine, γ ,4-Dihydroxy-2-(6-hydroxy-1-heptényl)-4cyclopentanecrotonic acide λ -lactone) (Sigma) a été fournie par le Docteur Marie-Andrée Hartmann. C'est un métabolite fongique isolé chez *Penicillium brefeldianum* qui perturbe l'appareil de Golgi (Satiat-Jeunemaitre et Hawes, 1992 ; Nebenführ *et al.*, 2002 ; Ritzenthaler *et al.*, 2002).

Le **taxol** (TAX) (paclitaxel) (Sigma) est un agent anti-tumoral isolé chez *Taxus yannanensis*. Il se fixe sur la région N-terminale de la β -tubuline et entraîne la formation de microtubules stables qui ne se dépolymérisent plus (Weerdenburg *et al.*, 1986 ; Yasuhara *et al.*, 1993).

L'oryzaline (ORY) (Fluka/Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Etats-Unis) a été fournie par Virginie Seltzer (IBMP, équipe d'Anne Catherine Schmitt). Ce composé a été utilisé pour dépolymériser les microtubules ; il provoque un arrêt du cycle cellulaire en métaphase (Morejohn *et al.*, 1987 ; Hugdahl et Morejohn, 1993).

La **cytochalasine D** (CYTD) (zygosporine A) (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Etats-Unis) est une toxine fongique de *Zygosporium mansonii* qui déstabilise les filaments d'actine et inhibe la polymérisation de l'actine (<u>Flanagan et Lin</u>, 1980; <u>Vaughan et Vaughn</u>, 1987).

L'ensemble des données portant sur l'utilisation des ces composés sont récapitulées dans la Figure MM.10 (page 281).

α.	Inhibiteur Abréviation Masse Moléculaire	Solvant	Concentra tion du stock	Stockage	Volume mis dans 3ml de culture cellulaire	Concentration finale utilisée
	Bréfeldine A BFA MM= 280,4 g/mol	DMSO	10 mg/ml	-20°C	3 µl	10 μg/ml
	Cafféine CAF MM= 194,2 g/mol	MS supplémenté	1 M	-20°C	30 µl	10 mM
	Paclitaxel (taxol) TAX MM= 853,9 g/mol	DMSO	6 mM	-20°C	1 μl	2 μΜ
	Cytochalasine D CYTD MM= 507,6 g/mol	DMSO	60 mM	-20°C	1 μl	20 µM
	Oryzaline ORY MM= 346,4 g/mol	DMSO	10 mM	-20°C	2 μl 1 μl	6,66 µМ 3,33 µМ

Ь.





Fig. MM.10: Inhibiteurs utilisés dans les expériences relatives au transport intracellulaire des protéines GFPs isoprénylables créées

a. Conditions d'utilisation de la bréfeldine A, la cafféine, le paclitaxel, la cytochalasine D et l'oryzaline

b. Structure chimique de la bréfeldine A

5.7 Les autres produits

L'acétosyringone (AS) (3',5'-Diméthoxy-4'-hydroxyacétophénone) (Fluka, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, Etats-Unis) (MM= 196.20 g/mol) a été fournie par Marie-Claire Criqui (IBMP). Elle est préparée à une concentration stock de 200 mM dans du DMSO 100% et conservée à -20°C ; il s'agit d'une molécule signal d'origine phénolique identifiée chez le tabac (Stachel *et al.*, 1985) ; cette molécule signal a été utilisée pour induire l'expression des gènes *vir* et permettre ainsi d'augmenter l'efficacité de transformation (Berthelot *et al.*, 1998). Elle a été utilisée à une concentration finale de 200 μ M et a été ajoutée dans le milieu de culture des agrobactéries YEB.

Le **D-mannitol** (Sigma) (MM= 182.17 g/mol) a été utilisé dans le but de provoquer une plasmolyse douce des cellules TBY-2. La solution stock (0,45 M) stérile est mise en présence des cellules dans les proportions 1 :1 (v/v) (concentration finale égale à 0,23 M).

Le **Triton®X-100** (4-(1,1,3,3-Tétraméthylbutyl)phényl-polyéthylène glycol) (Sigma) (d= 1,07 g/ml à 25°C) a été utilisé pour ses propriétés de détergent dans des essais de solubilisation des protéines GFP isoprénylables localisées dans la membrane plasmique des TBY2.

La **spermidine** (N-(3-Aminopropyl)-1,4-diaminobutane) (Sigma) (MM= 145.25 g/mol ; d= 0.925 g/ml à 25 °C) en solution a été utilisée dans le protocole de bombardement, stérilisée par filtration, aliquotée et stockée à -20°C.

6. Le matériel utilisé en biologie cellulaire

6.1 Les molécules fluorescentes

Le FM[®]4-64 (*N*-(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diéthylamino)phényl)hexatriényl) pyridinium dibromide) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, Etats-Unis) est un fluorochrome rouge ; il s'agit d'une molécule amphiphile qui a été utilisée (6.7 μ g/ml) dans notre travail afin de révéler la membrane plasmique (Bolte *et al.*, 2004b) des cellules TBY-2. Les membranes marquées émettent une fluorescence dans le rouge lointain qui est distinguée
de la fluorescence verte de la GFP dans le cas de colocalisations en utilisant des filtres optiques appropriés.

Le **MitoTracker[®]** Red CMXRos (Mitot) (Molecular probes) est un colorant vital émettant dans le rouge et permettant de mettre en évidence les mitochondries actives *in vivo* grâce à leur potentiel membranaire.

Le **farnésol fluorescent** (FolF) nous a été fournit par le Professeur Herbert Waldmann (MPI, Dortmund, Allemagne). Il s'agit d'une molécule synthétisée chimiquement composée de géraniol fusionné au NBD (7-nitrobenzène-2-oxa-1,3-diazol-)(OH-G-NBD) (**Reents** *et al.*, 2004). Le NBD mime la dernière unité isoprénique et confère à la molécule des propriétés fluorescentes proches de celles de la GFP.

L'ensemble des données relatives à l'utilisation du FM[®]4-64, du MitoTracker[®] et du farnésol fluorescent sont regroupées dans la **Figure** MM**.11** (**page 284**).

La **RFP-SKL** est une protéine chimère possédant un signal de localisation peroxysomal. Sa séquence génétique a été insérée, à la place de celle de la GFP, dans le vecteur pGFP-MRC pour donner le vecteur pRFP-SKL.

α.	Nom du fluorochrome Abréviation Masse Moléculaire	Solvant	Concentration de la solution stock	Stockage	Volume déposé sur lame (150µl de milieu de culture cellulaire)	Concentration finale
	FM [®] 4-64 MM= 608 g/mol	DMSO MS supplém- enté	1 mg/ml	-20°C à l'obscurité	1,5 μl	6.7 μg/ml
	MitoTracker[®] Mitot	DMSO	1mM	-20°C à l'abri de la lumière	0,5 µl	3,3 µM

Ь.

Nom du fluorochrome	Maximum d'absorption (λAbs)	Maximum d'émission (λEm)	
GFP	488 nm	511 nm	
FM [®] 4-64	543 nm	640 nm	
MitoTracker	579 nm	599 nm	



Fig. MM.11: Les différents composés fluorescents utilisés: le FM[®]4-64, le MitoTracker[®], et la protéine verte fluorescente (GFP) **a**. Conditions d'utilisation

b. Maximas d'excitation et d'émission des différents fluorochromes et de la GFP

c. Structure chimique du FM4-64 et du farnésol fluorescent

6.2 Le canon à particules

Un canon à particules du type Particle Inflow Gun (Finer *et al.*, 1992), perfectionné selon Brown *et al.* (1994), a été utilisé lors de ce travail dans le but de transformer transitoirement le matériel végétal choisi. Ce type de système biolistique est construit à partir d'éléments du commerce facilement accessibles. La chambre de bombardement est constituée par un assemblage de plaques métalliques raccordées au vide. Les particules placées sur la grille d'une seringue sont mises en mouvement par un flux d'hélium dont la durée est contrôlée par une minuterie qui détermine le temps d'ouverture d'une électrovanne.

6.3 La loupe binoculaire à fluorescence

Elle est de marque Leica (Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne) et de type LEICAMZ12. Elle possède un filtre bleu qui permet la sélection sur boîte des transformants transitoires exprimant la GFP.

6.4 Le microscope à fluorescence

Le matériel végétal exprimant une protéine fluorescente (telle que la GFP), ou mis en présence d'un fluorochrome, est observé grâce à un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY, Etats-Unis). Deux blocs filtres peuvent être utilisés pour observer la fluorescence verte de la GFP : un bloc filtre « long pass » (LP) (excitation (EX) 460-500 nm ; miroir dichroïque (DM) 505 nm ; émission (BA) 510 nm) et un bloc filtre « band pass » (BP) plus sélectif (EX 460-500 nm ; DM 505 nm ; BA 510-560 nm). Les prises de vue sont réalisées par une caméra Sony 950 DXC, numérisées et mémorisées grâce au système Visiolab 200 (Biocom).

6.5 Le microscope confocal

C'est un microscope inversé avec un module de type Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) monté sur un Axiovert 100M. Il est équipé de trois lasers : un laser argon qui émet une longueur d'onde à 488 nm et deux lasers hélium-néon qui émettent une raie de lumière continue à 543 nm ou 633 nm. La GFP est excitée à 488 nm grâce au laser argon et

l'émission de fluorescence est récupérée par un filtre « band pass » 505-550 nm. Les fluorochromes « rouges », FM[®] 4-64, MitoTracker et RFP-SKL, sont excités à 543 nm par le laser hélium-néon et la fluorescence émise est récupérée par un filtre « long pass » 585 nm (**Fig.** MM.12).



Fig. MM.12 : Configurations du microscope confocal utilisées lors des observations d'échantillons végétaux a. Configuration du microscope utilisée pour l'observation de la GFP ou du farnésol

b. Configuration utilisée pour l'observation de la GFP et du FM[®]4-64 ou du MitoTracker[®] ou de la RFP

Les images en lumière transmise ont été capturées au moyen des optiques de contraste interférentiel différentiel (DIC, Nomarski) et de l'illumination du laser. Elles sont présentées en simple section.

Le matériel végétal est observé, en premier, grâce à un objectif x10 (EC « Plan-Neofluar » ; distance de travail (« Working Distance », WD) WD= 5,6 mm ; à sec), un objectif x20 (« Plan-Apochromat » ; WD= 0,61 mm ; à sec), puis un objectif « C-Apochromat » x63 (ouverture numérique 1.2 ; WD= 0,24 mm ; à immersion dans l'eau). Les cellules d'intérêt sont numérisées avec le logiciel LSM510 version 2.8 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

La plateforme de microscopie confocale a été co-financée par le Centre National de la Recherche Scientifique, l'Université Louis Pasteur, la région Alsace et l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

Partie 2 : LES METHODES

1. Les méthodes biochimiques

1.1 Radiomarquage à l'acide mévalonique de protéines de cellules de tabac BY-2

20 ml de cellules TBY-2 de 7 jours (en phase stationnaire de croissance) sont transférées dans 80 ml de milieu de culture MS supplémenté (**Fig.** MM.1) en présence de 5 μ M de mévinoline et 1 μ M de squalestatine. Elles sont cultivées dans les conditions standard (voir ¶ 1.1-a.) pendant 16 heures. L'incorporation de 1 μ Ci de [2-¹⁴C]-MVA est réalisée sur 10 ml de cellules pendant 8 heures. Les cellules sont ensuite récupérées par filtration sous vide sur filtre fritté et congelées à -70°C avant d'en extraire les protéines.

1.2 Extraction des protéines

Les cellules congelées sont broyées dans de l'azote liquide. Après ajout de 1 ml de tampon d'extraction (**Fig.** MM.13), le tout est centrifugé à 4°C et 12900 x G pendant 15 min. Le surnageant contenant les protéines totales est récupéré et stocké à -20°C.

Tris-HCI (pH 8,5).	<u>1</u> 00 mM
Sucrose	0,25 M
EDTA	1 mM
EGTA	<u>1</u> mM
MgCl ₂	10 mM
DTT.	100 mM
PMSF	<u>1</u> mM
Leupeptine	10 µg/mL
· ·	

Fig. MM.13 : Composition du tampon d'extraction de protéines (TE)

1.3 Dosage des protéines par la méthode modifiée de Lowry

Les protéines sont dosées selon la technique de Lowry *et al.* (1951) qui a été modifiée dans le but de l'adapter aux cellules végétales (Bensadoun et Weinstein, 1976; Bach *et al.*, 1986).

Les volumes des essais protéiques sont ajustés à 1 ml avec de l'eau distillée avant d'ajouter 50 μ l de désoxycholate de sodium 2%. Le mélange est laissé 15 min à température ambiante. Après complexation des protéines avec le désoxycholate, elles sont précipitées avec 200 μ l d'acide trichloroacétique 30%. L'ensemble est centrifugé à 10000 RPM (rcf : 9200 x G ; centrifugeuse Sigma type 3K15 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Allemagne)) pendant 30 min à 4°C. Le culot protéique est resuspendu dans 2 ml de solution D (= 4 ml de

solution B + 4 ml de solution C + 100 ml de solution A (**Fig.** MM.14)) et 100 μ l de SDS 5%. 200 μ l de réactif de Folin : H₂O (1:1) sont ajoutés tout en agitant l'ensemble. Les tubes sont ensuite mis à incuber 10 min à 50°C.

Solution A	Solution B	Solution C
0,1 N NaOH 2% Na ₂ CO ₃ (H ₂ O)	2% CuSO ₄ (H ₂ O)	4% sodium potassium tartrate (H_2O)

Fig. MM.14 : Composition des différentes solutions utilisées dans les essais de dosage des protéines par la méthode modifiée de Lowry

La DO correspondant à chaque échantillon est mesurée à une longueur d'onde égale à 650 nm, avec pour référence un essai sans protéine. Une gamme étalon est réalisée à l'aide de BSA (sérum albumine bovine) (solution stock à 1 mg/ml). La concentration en protéines de chaque échantillon est déterminée par rapport à cette courbe étalon.

1.4 Electrophorèse monodimentionnelle en conditions dénaturantes

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide 12% - 0,1% SDS (Laemmli, 1970). La composition des gels de concentration et séparation est décrite dans la figure MM.15-a (**page 290**). Les échantillons protéiques dosés sont dilués quatre fois dans du tampon de charge (composition, **Fig.** MM.15-b) puis le mélange est chauffé à 100°C pendant 4 min afin de dénaturer les protéines. 15 µg de protéines sont déposés par puits sur un premier gel destiné à être coloré au nitrate d'argent puis au bleu de Coomassie. 88 µg de protéines sont déposés par puits sur un deuxième gel soumis à autoradiographie. L'électrophorèse, réalisée dans un système Protein II Slab Cell de Bio-Rad (Hercules, CA, Etats-Unis), est effectuée dans un tampon de migration dont la composition est donnée dans la **Figure** MM.15-c. Les échantillons sont mis à migrer (ampérage 25 mA et voltage 250 V) en parallèle d'un marqueur de masse moléculaire. Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire apparente.

α.		Gel de concentration	Gel de séparation
	Concentration en acrylamide	X=12%	4%
	Acrylamide stock 40%	V _{acrylamide} = (Xx100)/40= 30 ml	1,95 ml
	Eau distilée	V_{H2Od} = 73,5- $V_{acrylamide}$ = 43,5 ml	12,75 ml
	Tris-HCl 1,5 M , pH 8,8	25 ml	
	Tris-HCl 0,5 M , pH 6,8		5 ml
	SDS 10% (w/v)	1 ml	200 µl
	APS 10% (w/v)	500 µl	100 µl
	TEMED	50 µl	20 µl
	Volumes pour 2 gels	100 ml	20 ml

b.

Tampon de charge

Eau distillée	3,8 ml
Tris-HCl 0,5M , pH6,8	1 ml
Glycérol	0,8 ml
SDS 10% (w/v)	1,6 ml
2 β-mercaptoéthanol	0,4 ml
Bleu de bromophénol 0,05% (w/v)	0,4 ml
Volume total	8 ml

С.

Tampon de migration	ı
Tris	9 g
Glycine	14,4 g
SDS	3 g
Eau distilée qsp	11
pH 8,3	

Fig. MM.15 : Composition des gels et tampons utilisés en électrophorèse monodimensionnelle **a**. Composition du gel de concentration (polyacrylamide 12% - 0,1% SDS) et du gel de séparation

b. Composition du tampon de charge dans lequel sont dilués les échantillons protéiques

c. Composition du tampon de migration

1.5 Coloration du premier gel au nitrate d'argent puis au bleu de Coomassie

Le gel qui vient de migrer est placé directement dans une solution de fixation (Ethanol 30% ; acide acétique 10% ; eau distillée (qsp)) pendant 45 min. Il est ensuite baigné dans une solution de réduction (Ethanol 30% ; acétate de sodium 4 M (pH 6) 2,5% ; thiosulfate de sodium 0,1% ; eau distillée (qsp)) pendant 30 min. Après trois lavages de 10 min dans de l'eau distillée, il est coloré pendant 30 min (solution de coloration : nitrate d'argent 0,1% ; formaldéhyde 0,025% ; eau distillée (qsp)). Après avoir été lavé à l'eau distillée, le gel est mis en présence de révélateur jusqu'à coloration qui est stoppée avec de l'acide acétique 1% (v/v). Après un dernier lavage à l'eau distillée, il est incubé dans une solution de coloration (Bleu R-250, 2,5 g ; méthanol, 500 ml ; acide acétique, 70 ml ; eau distillée, 430 ml) pendant 30 min. Il est ensuite plongé dans plusieurs bains successifs d'une solution de décoloration (Méthanol, 300 ml ; acide acétique, 70 ml ; eau distillée, avoir été rincé à l'eau distillée, le gel est séché sous vide à 50°C pendant 2 heures.

1.6 Autoradiographie du deuxième gel

Cette technique permet de révéler les protéines ayant incorporé le radioélément ¹⁴ C issu du mévalonate.

Le gel qui vient de migrer est mis en présence d'une solution de fixation des protéines (Isopropanol (v/v) 25% ; acide acétique (v/v) 10% ; eau distillée (v/v) 65%) pendant 30 min. Il est ensuite incubé, 30 min sous agitation constante, dans un liquide scintillant de type AMPLIFY (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Etats-Unis) qui permet de convertir les radiations radioactives émises en lumière. Le gel est ensuite séché sous vide à 50°C pendant 2 heures avant d'être mis en contact d'un film hypersensible dans une cassette contenant un écran d'intensification placée à -70°C. Au bout de 6 semaines d'exposition, le film est développé grâce à un développeur automatique Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, Etats-Unis).

2. Analyse informatique des séquences

Les séquences nucléotidiques ou peptidiques ont été recherchées sur le site NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html</u>).

Des séquences similaires ont été recherchées en utilisant le programme BLAST (blastn pour les séquences nucléotidiques et blastp pour les séquences protéiques) dans différentes banques de données (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Les séquences peptidiques ont été analysées en utilisant différents programmes accessibles depuis le site EXPASY (http://www.expasy.org/) avec notamment, des sites de traduction nucléotidique séquence d'une séquence en peptidique (par exemple : http://www.expasy.org/tools/dna.html), des sites permettant l'analyse des paramètres physicoprotéique primaire chimiques d'une structure donnée (par exemple : http://www.expasy.org/tools/protparam.html), ou ceux permettant de prédire une localisation subcellulaire d'une protéine par exemple, PSORT (http://www.psort.org/), ou TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/).

Les séquences peptidiques ont été alignées en utilisant le serveur MULTALIN (version 5.4.1) (<u>http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html;</u> Corpet, 1988) ou grâce au programme CLUSTAL W (version 1.82) du site EBI (« European Bioinformatics Institute ») (<u>http://www.ebi.ac.uk/clustalw/;</u> Thompson J.D. *et al.*, 1994).

3. Les méthodes de biologie moléculaire

Toutes les techniques classiques de biologie moléculaires telles que le clonage, la transformation de bactéries rendues compétentes au CaCl₂, l'analyse des clones, les cultures de bactéries, la séparation des acides nucléiques sur gel d'agarose sont dérivées des protocoles décrits par Sambrook *et al.* (1989).

3.1 Production de bactéries *Escherichia coli* XL1-blue compétentes et transformation bactérienne

a. Technique du chlorure de calcium (CaCl₂)

- Production de bactéries compétentes

Les bactéries XL1-blue, résistantes à la tétracycline, sont ensemencées et mises à pousser sur une boîte LB solide (**Fig. MM.2**) supplémenté en tétracycline (12,5 μ g/ml) (**Fig. MM.3**), durant 12 heures à 37°C. Une colonie est prélevée dans le but de lancer une préculture, mise à agiter (190 RPM, agitateur rotatif GFL 3015, Gesellschaft für Labortechnik) pendant 12 heures à 37°C dans 3 ml de milieu LB liquide supplémenté en tétracycline (12,5 μ g/ml).

500 µl de cette préculture bactérienne de 3 ml sont mis en culture sous agitation à 37°C dans 50 ml de milieu LB à 37°C jusqu'à une DO_{590nm} de 0,4 (spectrophotomètre Shimadzu graphic printer PR-3 MPS-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Les étapes suivantes sont toutes réalisées sur glace. Les bactéries, transférées dans un tube type FalconTM, sont culotées 10 min à 4800 RPM (rcf : 4100 x G) et à 4°C. Le culot est resuspendu délicatement dans 10 ml de solution CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM ; PIPES 10 mM ; glycérol 15% ; pH 7). Les cellules sont ensuite centrifugées à 2500 RPM (rcf : 1100 x G) et à 4°C, et le culot est remis en suspension dans 10 ml de solution CaCl₂ ; les XL1-blue sont laissées 30 min sur glace puis à nouveau centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment avant d'être resuspendues dans 2 ml de solution CaCl₂ ; les cellules rendues compétentes sont aliquotées par 75 µl et stockées à -80°C.

- Transformation des bactéries par choc thermique

Les bactéries compétentes sont transformées avec un vecteur ou un produit de ligation.

Pour cela les bactéries stockées à -80°C sont décongelées sur glace pendant 15 min avant d'être mises en présence de la solution d'ADN d'intérêt (5 µl de milieu de ligation ou 10 ng de vecteur) pendant 20 min. Le mélange est ensuite placé 5 min à 37°C (choc thermique). Il est laissé 45 min à 37°C en présence de 500 µl de LB, avant d'être étalé sur milieu LB solide sélectif.

b. Technique d'électroporation

Cette technique est généralement utilisée pour transformer les bactéries avec un vecteur de grande taille (> 10000 pb), comme le vecteur pTA 7001.

- Production de bactéries compétentes

5 µl de bactéries électro-compétentes stockées à -80°C sont cultivées une nuit à 37°C sous agitation continue dans 10 ml de milieu LB où sont ajoutés 10 µl de tétracycline (12,5 mg/ml). Le lendemain, 5 ml de cette culture sont ajoutés à 50 ml de LB et mis à pousser sous agitation à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,7-0,8 (spectrophotomètre Shimadzu). Les cellules sont transférées dans un tube de type Falcon[™] et laissées durant 20 min sur glace avant d'être centrifugées à 4000 RPM (rcf : 2900 x G) pendant 5 minutes et à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu délicatement dans 50 ml d'eau milliQ stérile froide pour un premier lavage. Après une nouvelle centrifugation à 4000 RPM (rcf : 2900 x G) (4-5 minutes à 4°C), les bactéries sont relavées à l'eau milliQ trois fois de la même façon. Un dernier lavage est réalisé en resuspendant le culot bactérien dans 50 ml d'eau milliQ stérile froide supplémentée de 10% de glycérol stérile. Après une dernière centrifugation réalisée dans les mêmes conditions, le culot est resuspendu dans 1 ml d'eau milliQ supplémentée de 10% de glycérol. Les bactéries compétentes sont ensuite aliquotées (80-100 µl/tube) avant d'être stockées à -80°C.

- Transformation des bactéries par électroporation d'un vecteur d'intérêt

Les XL1-blue électrocompétentes, stockées à -80°C, sont décongelées sur glace pendant 15 min avant d'être mises en présence de 2-3 μ l de milieu de ligation ou 10 ng de vecteur. Ce mélange est transféré dans des cuvettes adaptées à l'électroporation placées dans l'électroporateur Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis) préalablement réglé à 2.5 kVolts, une capacitance de 25 μ F et une résistance de 200 Ohms. Immédiatement après avoir été transformées, les bactéries sont suspendues dans 500 μ l de milieu LB liquide puis placées à incuber à 37°C pendant 45 min avant d'être étalées sur boîte (LB solide sélectif).

3.2 Extraction d'ADN plasmidique

a. Technique de minipréparation d'ADN plasmidique

Une colonie d'*E. coli* ayant poussé sur boîte (milieu LB sélectif) est prélevée et utilisée pour inoculer 3 ml de milieu LB liquide sélectif. Cette culture bactérienne est incubée à 37°C pendant 12 heures sous agitation continue (200 RPM). Elle sera employée pour purifier l'ADN plasmidique d'intérêt soit par la technique classique de lyse alcaline soit en utilisant un kit commercial.

- Technique classique de lyse alcaline

1,5 ml de la culture bactérienne de 12 heures (volume total de 3 ml) sont transférés dans un tube de type « Eppendorf » et centrifugés à 12000 RPM (rcf : 13200 x G) pendant 1 min à 4° C. Le restant de la culture (1,5 ml) est traité de même et le culot résultant est suspendu dans 100 µl de solution I froide (solution I : Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM; solution autoclavée et stockée à 4°C). La lyse est réalisée par ajout de 200 µl de solution alcaline II (solution II : 10% NaOH 2,5 M, 10% SDS 10%, 80% H₂O). Le tube est inversé 6 à 8 fois et laissé 5 min à température ambiante. Sur le mélange devenu translucide sont ajoutés 150 µl de solution III froide (Solution III : 120 ml acétate de potassium 5 M, 23 ml acide acétique glacial, 57 ml H₂O, pH 4,8). Le tube est inversé 6 à 8 fois pour mélanger le tout. Cette étape permet la neutralisation du NaOH tout en précipitant l'ADN génomique et le SDS en un précipité blanc qui sera culoté après une étape de centrifugation de 15 min à 14000 RPM (rcf: 18000 x G) à 4°C. Les autres acides nucléiques (vecteur) contenus dans le surnageant sont précipités avec 500 µl d'isopropanol. Après une étape de centrifugation à 14000 RPM (rcf : 18000 x G) pendant 20 min à 4°C, le culot est séché 10 min à température ambiante. Il est ensuite dissout dans 100 µl d'eau et 1 µl de solution de RNase A (solution stock à 10 mg/ml, conservée à -20°C) ; le mélange est laissé à température ambiante pendant 30 min dans le but de digérer l'ARN résultant. Les protéines sont séparées de l'ADN plasmidique par ajout d'un volume de phénol/chloroforme 1 :1 (v/v) en mélange. L'ensemble est vortexé puis centrifugé à 14000 RPM (rcf: 18000 x G) pendant 10 min à température ambiante. La phase supérieure aqueuse est mélangée avec 10% de volume d'acétate de sodium (NaAc 3 M, pH 5,2 (acide acétique glacial) autoclavé) et 2 volumes d'éthanol absolu froid. Le tube est vortexé et placé à -20°C pendant 30 minutes. Après une centrifugation réalisée à 0°C, 12000 RPM (rcf : 13200 x G) pendant 20 minutes, le surnageant est éliminé délicatement. Le culot est lavé avec 750 μ l d'éthanol 70% froid et l'ensemble est centrifugé 5 min à 12000 RPM (rcf : 13200 x G) et à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est mis à sécher, tube à l'envers, à température ambiante (environ 10 min) avant d'être repris dans le volume désiré (20-50 μ l) de tampon stérile T₁₀E₁ pH 8 (0,5% de Tris 2 M ; 0,2% de EDTA 0,5 M ; 99,3% d'eau distillée). L'ADN est alors quantifié et conservé à -20°C.

- Utilisation de « kits » commerciaux

Les préparations d'ADN plasmidique peuvent être effectuées en utilisant un kit «QIAprep[®] Miniprep» de Qiagen (Hilden, Allemagne) ou «NucleoSpin[®] Plasmid » de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne) en suivant les consignes du fabriquant.

Ces préparations sont effectuées à partir de 3 ml d'une culture bactérienne de 12 heures.

b. Technique de midipréparation d'ADN

Les préparation de grandes quantités d'ADN plasmidique sont réalisées grâce au kit « Nucleobond[®] AX 100 » de Macherey-Nagel à partir de 25 ml de culture bactérienne. Les consignes du fabriquant ont été suivies.

Les plasmides purifiés peuvent être utilisés pour des réactions de PCR (\P 3.4), le clonage (\P 3.6), le séquençage (\P 3.7), la transformation transitoire par bombardement (\P 4.2) ou l'agroinfection (\P 4.3) ou encore pour une nouvelle transformation bactérienne (\P 3.1).

3.3 Extraction des ARNs totaux de riz

Les ARNs sont extraits à partir de plantules de riz de 4 jours (conditions de culture, ¶ 1.1.-c.) car le gène de la calmoduline 61 y est fortement exprimé (Xiao *et al.*, 1999). 50 mg de plantules sont homogénéisés en présence de 100 μ l de phénol et 200 μ l de solution NTE (solution NTE : NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%). 100 μ l de chloroforme sont ensuite ajoutés et l'ensemble est vortexé 1 min puis centrifugé 3 min à 9000

G (4°C). La phase aqueuse contenant les ARNs et l'ADN est récupérée et les ARNs sont mis à précipiter avec un volume d'acétate de lithium 4 M sur glace pendant 3 heures. Après 10 min de centrifugation (12500 RPM) le culot obtenu est lavé avec 800 μ l d'éthanol 70%. Le culot final est repris dans 10 μ l d'eau. L'analyse et la quantification des ARNs totaux sont réalisées sur gel d'agarose. Les ARNs en solution sont aussi quantifiés par photométrie.

3.4 Amplification de matériel génétique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (« Polymerase Chain Reaction »)

a. Réaction de PCR classique

Il s'agit d'amplifier une matrice ADN. Dans chaque cas, l'on met en présence, dans les tubes réactionnels placés sur glace, suivant le même ordre: l'eau stérile, du magnésium, le tampon de l'enzyme, la matrice, les deux types d'oligonucléotides utilisés comme amorce sens et antisens (voir **Annexe 3**), les dNTPs, l'enzyme polymérase (**Fig.** MM.16, page 298). Le choix de la polymérase utilisée pour la réaction dépend du but de la PCR : si le fragment à amplifier est utilisé à des fins de clonage, seule la Hifi sera choisie pour sa haute fidélité ; cette enzyme rajoutte des déoxyadénosines sortantes permettant le clonage dans le vecteur pGEM[®]-T. Si par contre, la réaction de PCR a pour but de vérifier, par exemple, la présence d'un vecteur dans une souche bactérienne (XL1-blue, *Agrobacterium tumefaciens*) ou d'un insert dans un vecteur après clonage, c'est la DyNAzyme qui sera choisie pour la réaction. Les tubes sont transférés dans un appareil de type GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, Etats-Unis) et le programme réactionnel est lancé. Il est basé sur le programme type de la figure MM.16.

Les produits de réaction sont déposés sur gel d'agarose puis extraits. Ils peuvent aussi être purifiés directement avec le kit commercial « NucleoSpin[®] Extract » de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne).

Mélange réactionnel typique utilisé avec la DyNAzyme:			Mélange réactionnel pour Hifi:		
	Eau stérile	: qsp 50 µl		Eau stérile	: qsp 25 µl
•	MgCl ₂ 25 mM	: 2 µl	•	MgCl ₂ 25 mM	: 1,5 µl
•	Tampon pour DyNAzyme10x ¹ Matrice (1 µg)	: 5 µl	•	Matrice ADN plasmidique	: 10-50 ng
•	Oligonucléotide sens 20 µM	: 1 µl	•	Oligonucléotide sens 20 pmol/µl	: 1 µl
•	Oligonucléotide anti-sens 20 µl	νl:1μl	•	Oligonucléotide anti-sens 20 pmol/µl	: 1 µl
•	dNTPs 10 mM	: 1,5 µl	•	Solution « High Fidelity PCR Master » 2x ²	:12,5 μl
•	Dynazyme 2 U/µl	: 0,5 µl			

 $^1Composition du tampon pour DyNAzyme (10x): Tris-HCl (500 mM), MgCl_2(15 mM), (NH_4)_2SO_4 (150 mM), Triton X-100 (1 %), pH=9.0 (à 25°C)$

²Composition de la solution « High Fidelity PCR Master » (2x): enzymes (*Taq* ADN et *Tgo* ADN polymérases en mélange (≥ 75 U/ml) dans Tris-HCl (100 mmol/l)), (NH₄)₂SO₄ (44 mmol/l),nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (0,4 mmol/l chacun), MgCl₂ (3 mmol/l), pH=8,9 (à 25°C)

Ь.

۵.



Fig. MM.16 : Amplification de matériel génétique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (« Polymerase Chain Reaction »)

a. Milieux réactionnels

b. Programme couramment utilisé lors de la réaction d'amplification

b. Mutagénèse ponctuelle

Ce type de réaction de PCR a été réalisée dans le but de muter un aminoacide situé dans la séquence C-terminale du motif d'isoprénylation CaaX ; il s'agit soit de la Cystéine C de ce motif mutée en Sérine (C/S) afin d'obtenir un contrôle non isoprénylable, soit du résidu C-terminal X, modifié en Méthionine afin de rendre la séquence protéique farnésylable.

La mutagénèse ponctuelle est réalisée par réaction de PCR dans les conditions classiques (voir \P 3.4-a. (Partie 2)) mais avec une amorce anti-sens particulière codant pour le résidu à muter (**Annexe 3**).

c. Transcriptase réverse-PCR (RT-PCR)

Le domaine C-terminal de la calmoduline 61 a été amplifié par réaction de transcriptase réverse-PCR.

Après avoir vérifié la qualité de l'ARN et déterminé sa concentration sur gel d'agarose et par photométrie, 4 µg d'ARN total de riz (¶ 3.3 (Partie 2)) sont placés dans un tube à PCR et incubés pendant 10 min à 70°C en présence de 12,5 µl de tampon réactionnel pour RT/Taq (dNTPs 0,4 mM ; MgSO₄ 2,4 mM), 6 µl d'eau DEPC, 1 µl d'oligonucléotide RC61F (5 µM) et 1 µl d'oligonucléotide RC61R (5 µM) (**Annexe 3**). Après 3 min sur glace et 20 sec de centrifugation, le mélange est incubé 2 min à 42°C. Un volume de 0,5 µl de réverse transcriptase/Taq ADN polymérase SuperscriptTM II mix est ajouté au milieu réactionnel avant d'effectuer le programme PCR. La synthèse de l'ADNc a lieu pendant la première étape réalisée à 42°C pendant 50 min. Elle sera suivie par l'amplification de la séquence C-terminale de la CaM61 selon le programme PCR suivant : 94°C – 3 min, (94°C – 15 sec, 55°C – 30 sec, 72°C – 1 min) 40 fois, 72°C – 10 min, 4°C-∞.

Le produit de PCR correspondant à la séquence C-terminale de la protéine OsCaM61 (domaine basique suivi de la séquence CVIL) obtenu, est déposé et séparé sur gel d'agarose 1% (ADNg :400 pb ; ADNc : 280 pb). L'ADN d'intérêt est extrait du gel à l'aide d'un kit commercial du type QIAEXII de Qiagen (Hilden, Allemagne).

3.5 Fractionnement, purification et quantification de matériel génétique

a. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose

Le matériel génétique (le plus souvent, produits de réaction de PCR, produits de digestion) est séparé et quantifié par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour un gel, 12,5 ml du mélange suivant sont déposés et coulés : l'agarose en poudre (0,5% à 2% selon la taille des fragments à faire migrer) est dilué à la chaleur dans du tampon TAE 1x (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8 (acide acétique)) en présence de bromure d'éthidium (BET) 1 μ g/ml (solution stock à 10 mg/ml ; MM= 394,3 g/mol (Sigma). Le BET est un agent intercalant qui permet de visualiser le matériel génétique sous UV.

La solution contenant le matériel génétique est déposée à l'aide d'un tampon de charge bleuté 6x (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol FF 0,25%, Ficoll (type 400, Pharmacia) 15%, dans l'eau) dans un puit et mise à migrer (60 V) en parallèle d'un marqueur de taille de type MassRulerTM (Fermentas Inc., Hanover, MD, Etats-Unis) ; ce marqueur donne une estimation de taille et de concentration du matériel car les intensités des bandes d'intérêt peuvent être calibrées par rapport à celle des fragments standards. Lorsque le(s) fragment(s) d'intérêt sont séparés, ils sont découpés sous UV avec une lame de scalpel avant d'être élués et purifiés.

b. Elution du fragment d'intérêt

L'ADN d'intérêt est extrait et purifié à l'aide du kit « NucleoSpin[®] Extract » de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne) selon les instructions du fabriquant. C'est une technique basée sur une technologie de membrane de silice. Elle permet à la fois d'extraire les fragments d'ADN de plus de 100 pb ayant migré sur gel d'agarose et de purifier directement les produits de PCR.

c. Quantification du matériel génétique

La concentration d'une solution (ADN ou ARNs) peut être déterminée par photométrie (une unité de DO_{260nm} correspond à ~40 µg/ml d'ARN ou ~50 µg/ml d'ADN double brin) à l'aide d'un appareil type BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne). Le témoin utilisé correspond au tampon dans lequel est conservé le matériel génétique (eau ou tampon T₁₀E₁). Le ratio entre les lectures à 260 nm et 280 nm (DO_{260nm}/DO_{280nm}) permet de donner un indice quant à la pureté de la solution d'acides nucléiques dosée.

d. Extraction par la technique phénol/chloroforme

Le volume de la solution à extraire est ajusté à 200 μ l avec de l'eau distillée stérile avant d'ajouter un volume de mélange phénol/chloroforme 1 :1 (v/v). L'ensemble est mélangé au vortex et centrifugé 3 min à 12000 RPM (rcf : 13200 x G) à température ambiante. La phase supérieure aqueuse est réupérée et est précipitée à l'éthanol.

e. Précipitation à l'éthanol

L'ADN en solution est mis en présence de 10% de volume d'acétate de sodium (NaAc stock 3 M, pH 5,2 (acide acétique glacial) autoclavé). Après homogénéisation, sont ajoutés de 2 volumes d'éthanol absolu froid. Les tubes sont vortexés et placés à -20°C pendant 30 minutes. Après une centrifugation réalisée à 0°C, 12000 RPM (rcf : 13200 x G) pendant 20 minutes, le surnageant est éliminé délicatement. Le culot est lavé avec 750 μ l d'éthanol 70% froid et l'ensemble est centrifugé 5 min à 12000 RPM (rcf : 13200 x G) à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est mis à sécher à température ambiante avant d'être repris dans le volume désiré de tampon stérile T₁₀E₁ pH 8 (0,5% de Tris 2 M ; 0,2% de EDTA 0,5 M ; 99,3% d'eau distillée).

3.6 Clonage de fragments d'ADN

Le clonage moléculaire consiste à introduire un fragment d'ADN (insert) dans un vecteur. Cette technique a permis la création de différents vecteurs qui ont permis exprimer une protéine d'intérêt dans un matériel végétal donné de manière transitoire (vecteurs pGFP, **Fig.** MM.17) ou stable (vecteurs pTA, **Fig.** MM.18).

a. Digestion enzymatique

L'ADN plasmidique (50 ng) ou le produit de PCR est digéré pendant 12 heures à 37°C par une enzyme de restriction adéquate. Le milieu réactionnel (volume réactionnel de 20 µl) est composé de : 2 µl tampon 10x concentré (fournit avec chaque enzyme), 0,5 µl de BSA (10 mg/ml), 1 µl d'enzyme de restriction (simple digestion) l'ADN à digérer. Il est complété avec de l'eau distillée stérile. L'insert et le vecteur sont digérés en parallèle.

Dans le cas des doubles digestions, les deux enzymes sont mises dans le même milieu réactionnel si elles sont actives dans le même tampon, sinon, une précipitation à l'éthanol sera réalisée entre les deux digestions.

b. Ligation enzymatique

Cette étape consiste à « souder » l'ADN hétérologue (insert à cloner) avec l'ADN du plasmide, tous deux clivés avec les mêmes endonucléases de restriction. L'enzyme catalysant cette réaction, la T4 ADN ligase, permet la ligation d'extrémités cohésives ou « blunt-end ». Elle provient de chez Gibco-BRL[®]-Invitrogen (Carlsbad, California, Etats-Unis).

Le milieu réactionnel d'un volume total de 20 μ l contient : 4 μ l de tampon réactionnel (50 mM Tris-HCl (pH 7,6) ; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP ; 1 mM DTT ; 5% (p/v) polyéthylène glycol-8000 ; stocké à -20°C), 1 μ l d'enzyme T4 ADN ligase (soit 1 unité), le vecteur linéarisé et l'insert (digérés avec les mêmes enzymes de restriction) en veillant à avoir 3 à 4 fois plus de moles d'insert que de plasmide. Cette réaction est laissée 12 heures à 4°C.

Pour la ligation des produits de PCR dans le vecteur pGEM[®]-T, le milieu réactionnel (volume total de 10 µl) se compose de : 5 µl de tampon de ligation fournit (30 mM Tris-HCl (pH 7,8) ; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT ; 1 mM ATP), 1 µl de T4 ADN ligase (soit 3 unités), 1 µl de vecteur pGEM[®]-T (50 ng/µl), et 3 µl de produit de PCR (insert) amplifié à l'aide d'une polymérase générant des déoxyadénosines 3'-terminales (en général la Hifi). En parallèle sont effectués, un contrôle positif (avec l'insert fournit par le fabriquant), et un contrôle « background » (réaction de ligation sans insert). La réaction est réalisée à 4°C pendant 12 heures.

Un volume de 5 µl de chacun de ces milieux réactionnels est utilisé pour transformer les bactéries XL1-blue compétentes. La méthode de transformation par choc thermique est préférée dans le cas des vecteurs de petite taille (pGEM[®]-T ou pGFP-MRC). Si le vecteur est de grande taille (pTA 7001), les bactéries XL1-blue seront électroporées avec 2 µl de milieu réactionnel. Les cellules possédant le plasmide hybride ont acquis une résistance à un antibiotique et sont sélectionnées sur milieu LB solide additionné de cet antibiotique. Les bactéries transformées avec pGEM[®]-T sont cultivées sur milieu LB solide supplémenté d'ampicilline, de X-Gal et d'IPTG afin de discriminer les colonies ayant intégré un vecteur avec ou sans insert.

3.7 Séquençage d'ADN

Le séquençage de l'ADN est réalisé sur un appareil automatique Applied Biosystems (biosynthesis Inc., Lewisville, TX, Etats-Unis) modèle 373A par Philippe Hammann et Malek Alioua. La méthode de séquençage utilisée dérive de celle de Sanger et coll. (1977).

4. Les méthodes de biologie cellulaire

4.1 Mesure de la croissance de suspensions cellulaires de TBY-2

a. Mesure de la densité optique d'une suspension cellulaire : turbidimétrie

1 ml de culture cellulaire est prélevé à un temps donné pour en mesurer sa densité optique à 600 nm (spectrophotomètre Shimadzu graphic printer PR-3 MPS-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Le témoin d'absorption utilisé correspond à 1 ml de milieu de culture MS supplémenté. Dans le but d'obtenir une courbe de croissance, cette mesure est réalisée à intervalles de temps (24 heures) réguliers.

b. Méthode « Packed Cell Volume » (P.C.V.)

0,5 ml ou 1 ml de culture cellulaire est centrifugé à 12500 RPM (rcf : 10500 x G) pendant 5 min. Le volume qu'occupe le culot cellulaire résultant est estimé en microlitres de cellules. Chaque mesure est réalisée deux fois. Cette expérience est répétée dans le temps (24 heures) afin d'obtenir une courbe de croissance.

c. Mesure du poids du culot

En complément aux deux premières méthodes (turbidimétrie et P.C.V.), 0,5 ml ou 1 ml de cellules TBY-2 est prélevé, centrifugé à 12500 RPM (rcf : 10500 x G) pendant 5 min. Le poids du culot obtenu est pesé (en milligrammes) à l'aide d'une balance de précision Precisa 240A (Precisa Instruments AG, Dietikon, Suisse). Cette mesure est répétée à des intervalles de temps réguliers (24 heures) afin d'obtenir une courbe de croissance.

4.2 Transformation transitoire du matériel végétal par biolistique

Le vecteur pGFP-MRC (contient la séquence codant pour la protéine GFP) ainsi que les différents vecteurs pGFP créés (contenant les séquences codant les protéines de fusion d'intérêt) (**Fig.** MM.17, **page 305**) ont été utilisés afin de transformer par bombardement le matériel végétal d'intérêt. Pour chaque expérience de transformation, le vecteur pGFP-MRC est bombardé en tant que contrôle positif en parallèle des différentes constructions étudiées.

a. Préparation des particules

Pour un échantillon (soit deux tirs ou une boîte de pétri), 1 mg de particules de tungstène M-17 de diamètre 1.1 µm (Bio-Rad) est homogénéisé dans 1 ml d'éthanol absolu afin de séparer les particules pouvant être agglomérées. L'ensemble est laissé à stériliser pendant 20 min (temps qui permet de récupérer les particules au fond du tube et non sur les parois). Après 2 min de centrifugation à 9000 G et à température ambiante, le surnageant est éliminé et les particules formant le culot sont séchées dans une cloche à vide 4 min afin d'éliminer toutes traces d'éthanol. Elles sont ensuite resuspendues dans 16,5 µl de glycérol 50%. L'ADN qui va être précipité sur les particules est préférentiellement purifié par kit commercial (toute impureté de la solution au moment de l'étape de précipitation peut être néfaste); cette solution peut être diluée si besoin, avec de l'ADN de sperme de saumon (1 mg/ml, stérile et soniqué). 4 µg de solution d'ADN vectoriel sont mis en présence des particules. Sont ensuite ajoutés 16,5 µl de CaCl₂ 2 M puis 7,5 µl de spermidine 2 M, respectivement agents de précipitation et de protection du matériel génétique. Après avoir été vortexé 30 sec, le



Nom de la séquence à cloner dans pGFP-MRC	Oligonucléotides utilisés pour amplifier la séquence correspondante par PCR	Matrice utilisée pour la réaction d'amplification	Sites de restriction utilisés pour cloner la séquence amplifiée	Nom de la protéine de fusion créée	Nom du vecteur créé
DBCaM-CVIL	RC61F RC61R	ARNs de riz (RT-PCR)	SacI et XbaI	GFP-DBCaM-CVIL	pGFP-DBCaM-CVIL
DBCaM-CVIM	RC61F RC61MutR	"	SacI et XbaI	GFP-DBCaM-CVIM	pGFP-DBCaM-CVIM
DBCaM-CCG	RC61F RCCCGR	11	Sacl et Xbal	GFP-DBCaM-CCG	pGFP-DBCaM-CCG
DBCaM-SVIL	RC61F BDSVILR	"	SacI et XbaI	GFP-DBCaM-SVIL	pGFP-DBCaM-SVIL
DBCaM-SVIM	RC61F BDSVIMR	"	SacI et XbaI	GFP-DBCaM-SVIM	pGFP-DBCaM-SVIM
Δ12Rop6-CSIL	BDD187F GFPScaR	"	SacI et ScaI	GFP-A12Rop6-CSIL	pGFP-A12Rop6-CSIL
Δ20Rop6-CSIL	BDD179F GFP-ScaR	11	SacI et ScaI	GFP-A20Rop6-CSIL	pGFP-A20Rop6-CSIL
Δ26Rop6-CSIL	BDD173F GFPScaR	"	SacI et ScaI	GFP-A26Rop6-CSIL	pGFP-A26Rop6-CSIL
Δ32Rop6-CSIL	BDRop6F GFPScaR	"	SacI et ScaI	GFP-A32Rop6-CSIL	pGFP-A32Rop6-CSIL
Δ32Rop6-SSIL	BD-C/S GFPScaR	"	SacI et ScaI	GFP-A32Rop6-SSIL	pGFP-A32Rop6-SSIL
AtRop6-CSIL	AtRopF AtRop6R	Banque d'ADNc d'Arabidopsis	SacI et ScaI	GFP-AtRop6-CSIL	pGFP-AtRop6-CSIL
AtRop6-CSIM	AtRopF AtRopMut	pGEM-T-AtRop6-CSIL	SacI et ScaI	GFP-AtRop6-CSIM	pGFP-AtRop6-CSIM
AtRop6-C/S	AtRopF AtRopC/S	11	SacI et ScaI	GFP-AtRop6-C/S	pGFP-AtRop6-C/S

Fig. MM.17: Clonages réalisés dans le vecteur pGFP-MRC en C-terminal de la séquence de la GFP Les séquences des oligonucléotides utilisés sont données en annexe3

GFP3F et TERMR sont deux oligonucléotides employés pour vérifier la présence des inserts clonés en C-terminal de la sGFP par réaction PCR et pour leur séquençage ; sont précisées les positions des sites des endonucléases de restriction (*SacI*, 1624; *XbaI*, 1835; *ScaI*, 2971) ; les sites *SacI* et *XbaI* ont été utilisés pour le clonage des séquences nucléotidiques correspondant à DBCaM-CVIL (pGFP-DBCaM-CVIL), DBCaM-CVIM (pGFP-DBCaM-CVIM), DBCaM-CCG (pGFP-DBCaM-CCG), DBCaM-SVIL (pGFP-DBCaM-SVIL), DBCaM-SVIM (pGFP-DBCaM-SVIM) ; les sites *SacI* et *ScaI* ont été utilisés pour le clonage des séquences nucléotidiques correspondant à Δ12Rop6-CSIL, Δ20Rop6-CSIL, Δ26Rop6-CSIL, Δ32Rop6-CSIL, Δ4Rop6-CSIL, Δ4ROP6-CSI

L'ensemble des vecteurs créés ont été utilisés pour transformer transitoirement le matériel

mélange uniformisé est laissé reposer 20 min à température ambiante. Il est ensuite centrifugé 30 sec à 350 G. Les particules sont lavées successivement dans 150 μ l d'éthanol 70% et 100%. Le culot obtenu après centrifugation (350 G) est séché sous vide durant 5 min puis repris dans 14 μ l d'éthanol absolu. Cette solution servira à bombarder une boîte de Pétri soit deux tirs de 7 μ l chacun.

b. Préparation du matériel végétal

5 ml de cellules TBY-2 sauvages âgées de 3 jours ayant poussé dans les conditions standard de culture sont déposés, juste avant le bombardement, sous la hotte sur un papier filtre stérile (type papier Whatman[®] 3MM ; Ø 5,5 cm) lui-même placé sur un filtre fritté, pour être filtrées sous vide. Les cellules sont ensuite transférées dans une boîte de Pétri (Ø5.5 cm) contenant du milieu MS solide (agar 0.5%) supplémenté.

Etape de plasmolyse des cellules (non obligatoire) : après avoir été filtrées, les cellules sont transférées dans une boîte de Pétri (Ø5.5 cm) contenant du milieu MS supplémenté solide plasmolysant (agar 0,5% ; milieu MS supplémenté classique ; sorbitol 0,2 M ; mannitol 0,2 M) 5 heures avant l'étape de bombardement proprement dite.

Les tissus épidermiques de poireau et d'oignon sont prélevés extemporanément et trempés 30 sec dans une solution de prébombardement (MS 0.44%; mannitol 12%; MES 20 mM; ajuster à pH 7 avec une solution de KOH 1M) avant d'être déposés au centre d'une boîte de Pétri (Ø 5.5 cm) contenant du milieu MS supplémenté solide (1% d'agar). L'agar est un support permettant d'absorber le choc lié au tir. Il permet ensuite de conserver le matériel végétal sous atmosphère humide jusqu'à observation sous microscope.

c. Bombardement

Chaque boîte de Pétri contenant le matériel végétal est placée dans la chambre du canon à une distance fixée, après les expériences d'optimisation réalisées, à 11cm de la seringue (valeur pour laquelle l'efficacité de transformation est maximale, voir Chapitre I). 7 μ l de particules sont déposés dans la seringue. Le vide est effectué progressivement dans la chambre jusqu'à

atteindre 0,9 bar (valeur fixée d'après les expériences d'optimisation réalisées, voir Chapitre I) pour les cellules TBY-2 et 0,6 bar pour les tissus épidermiques. Le tir est ensuite déclenché avec un temps d'ouverture de l'électrovanne réglé à 25 ms (pression de sortie du gaz entraîneur (hélium) réglée à 7 bars). Le vide est ensuite cassé et la boîte tournée de 180°C. La seringue est rechargée avec 7 μ l de particules et un deuxième tir est réalisé dans les mêmes conditions. Pour chaque construction, un minimum de deux boîtes de Pétri sont bombardées.

d. Expression transitoire des protéines d'intérêt

Après bombardement, les boîtes contenant les cellules TBY-2 ou les tissus de poireau ou d'oignon sont placées en chambre de culture à 26°C et à l'obscurité. Les cellules de tabac ayant été plasmolysées, seront transférées après transformation sur du milieu MS solide classique avant d'être placées dans la chambre tempérée. Les transformants sont observés et sélectionnés après 16 à 20 heures de culture

e. Sélection des transformants et observation du matériel végétal

Les boîtes de Pétri contenant les cellules ou tissus épidermiques bombardés sont observées sous loupe binoculaire à fluorescence. Afin d'enrichir les échantillons cellulaires qui seront observés par la suite au microscope, les cellules TBY-2 exprimant la GFP sont prélevées sous la loupe puis placées sur lame. Les tissus épidermiques sélectionnés sous loupe binoculaire pour leur fort contenu en cellules fluorescentes sont placés sur lame. Sont ensuite ajoutés sur les échantillons, cellules de tabac ou tissus, un peu de milieu MS supplémenté (environ 150 µl) puis la lamelle. Le matériel végétal est alors observé au microscope à fluorescence. Les cellules d'intérêt seront visualisées avec l'objectif le plus petit avant de passer à un objectif plus agrandissant avant d'être numérisées. Les lames peuvent être ensuite observées au microscope confocal.

4.3 Transformation stable des cellules de tabac BY-2 par agroinfection

Cette technique a été employée afin de créer des lignées de cellules TBY-2 transformées stablement avec les différents vecteurs pTA construits (**Fig.** MM.18). Le protocole d'agroinfection est dérivé de celui de Criqui et coll. (2000).



Nom de la séquence clonée	Oligonucléotides utilisés pour amplifier la séquence	Matrice utilisée pour la réaction d'amplification	Sites de restriction utilisés pour cloner la séquence dans pTA 7001	Nom de la protéine pouvant être exprimée sous la dépendance du promoteur inductible à la dexaméthasone	Nom du vecteur créé
GFP	pGFPXHF pGFPSPR	pGFP-MRC	SpeI et XhoI	GFP	pTA-GFP
GFP-DBCaM-CVIL	pGFPXHF pGFPL1R	pGFP-DBCaM-CVIL	"	GFP-DBCaM-CVIL	pTA-GFP-DBCaM-CVIL
GFP-DBCaM-CVIM	pGFPXHF pGFPS1R	pGFP-DBCaM-CVIM	n	GFP-DBCaM-CVIM	pTA-GFP-DBCaM-CVIM
GFP-DBCaM-SVIL	pGFPXHF SLSp	pGFP-DBCaM-SVIL	n	GFP-DBCaM-SVIL	pTA-GFP-DBCaM-SVIL
GFP-DBCaM-SVIM	pGFPXHF SMSp	pGFP-DBCaM-SVIM	n	GFP-DBCaM-SVIM	pTA-GFP-DBCaM-SVIM
GFP-AtRop6-CSIM	pGFPXHF CMSp6	pGFP-AtRop6-CSIM	"	GFP-AtRop6-CSIM	pTA-GFP-AtRop6-CSIM
GFP-AtRop6-C/S	pGFPXHF SMSp6	pGFP-AtRop6-C/S	n	GFP-AtRop6-C/S	pTA-GFP-AtRop6-C/S

Fig. MM.18 : Clonages réalisés dans le vecteur d'expression stable pTA 7001

L'ensemble des clonages réalisés dans le vecteur pTA 7001 ont été réalisés entre les sites SpeI et XhoI

3A-T-3', LBR et pTAF sont trois oligonucléotides utilisés pour vérifier la présence par PCR d'un insert entre les sites de clonage *SpeI* (4894) et *XhoI* (4941) ou pour son séquençage ; P6UASR et P6UASF sont deux oligonucléotides utilisés pour vérifier la présence du promoteur P6xUASgal4 ; sont précisées les positions des deux sites des endonucléases de restriction utilisés (*SpeI*, 4894 ; *XhoI*, 4941) pour le clonage des séquences nucléotidiques correspondant aux protéines de fusion GFP étudiées (GFP, GFP-DBCaM-CVIL, GFP-DBCaM-CVIM, GFP-DBCaM-C/S, GFP-AtRop6-CSIM, GFP-AtRop6-C/S)

Les séquences des oligonucléotides sont données en Annexe 3

Les vecteurs créés ont été utilisés afin de transformer stablement les cellules TBY-2 par agroinfection

a. Production d'agrobactéries électro-compétentes

5 µl d'agrobactéries compétentes stockées à -80°C sont mises en culture, à 28°C, sous agitation, pendant 2 jours dans 10 ml de YEB supplémenté en présence de 10 µl de streptomycine stock (50 mg/ml). 2 ml de cette culture sont alors prélevés et ajoutés à 100 ml de milieu de culture YEB supplémenté (antibiotique) ; cette culture est placée à 28°C sous agitation 12 heures. La culture qui a une DO₆₀₀ égale à 1.2 (spectrophotomètre Shimadzu) est transférée dans des tubes type Falcon[™] puis placée 20 min sur glace. Elle est centrifugée à 5000 RPM (rcf : 4500 x G) 5 min à une température de 4°C. Le culot bactérien est resuspendu dans 40 ml d'eau milliQ stérile froide pour un premier lavage. Les cellules sont ensuite centrifugées à 5000 RPM (rcf : 4500 x G) pendant 5 min et à 4°C. Le culot est lavé deux fois de la même manière puis est resuspendu dans 25 ml d'eau milliQ stérile froide avec 10% de glycérol. Après une nouvelle centrifugation (5500 RPM (rcf : 5400 x G), 8 min, 4°C) le culot est repris dans 1 ml d'eau milliQ avec 10% de glycérol et les agrobactéries sont aliquotées puis stockées à -80°C.

b. Transformation des agrobactéries par électroporation

Les agrobactéries électrocompétentes sont décongelées sur glace puis mises en présence de 2 μ l de solution de vecteur pTA (**Fig. MM.18**). L'ensemble est transféré dans une cuvette qui est placée dans l'électroporateur Gene Pulser II (Bio-Rad). Les agrobactéries sont transformées et immédiatement resuspendues dans 1 ml de milieu YEB supplémenté. Elles sont incubées à 26°C pendant 1 heure puis étalées sur une boîte contenant du YEB supplémenté en kanamycine (30 µg/ml final) et en streptomycine (50 µg/ml final). Elles sont ensuite mises à pousser à 26°C à l'obscurité, jusqu'à l'obtention de colonies (2-3 jours). Ces boîtes peuvent être stockées à 4°C.

c. Préparation des agrobactéries

Plusieurs colonies sont mises à pousser dans un milieu YEB liquide sélectif (kanamycine 30 μ g/ml final et streptomycine 50 μ g/ml final) à 26°C sous agitation constante. Après 2 jours de culture, les agrobactéries sont collectées par centrifugation à 4000 RPM (rcf : 1050 x G) pendant 10 min. Une réaction de PCR est réalisée sur chaque culture pour vérifier la présence de l'ADN-T (oligonucléotides 3A-T-3' et pTAF, voir **Annexe 3** et **Fig.** MM.18). Le culot d'une colonie positive est lavé par resuspension dans 2 ml de MgSO₄ 10 mM. Après centrifugation, les cellules sont mises en présence de 2 ml de MgSO₄ 10 mM et d'acétosyringone 200 μ M. Elles sont laissées 30 min à 1 h à 26°C.

d. Coculture agrobactéries/TBY-2

100 μ l de solution d'agrobactéries sont mises en présence de 4 ml de cellules TBY-2 de 3 jours dans une boîte de pétri (Ø9cm). Le mélange est homogénéisé doucement et laissé à 25-26°C à l'obscurité pendant 2 jours. La température est un paramètre important à prendre en compte lors de la coculture car il semblerait qu'elle affecte le transfert de l'ADN-T ; la température de coculture doit être comprise entre 19 et 26°C est choisie (Fullner et Nester, 1996).

e. Sélection des transformants stables

La co-culture est mise en présence de 25 ml de milieu MS supplémenté. Les cellules TBY-2 sont récupérées par centrifugation à 1000 RPM (rcf : 180 x G) pendant 5 min à température ambiante. Les cellules sont ainsi lavées 3 fois. Le culot cellulaire obtenu après le dernier lavage est mis en présence de 10 ml de MS supplémenté et de 500 μ g/ml de carbénicilline ainsi que de 113 μ g/ml d'hygromycine B. La culture est placée sous agitation (154 RPM, agitateur New Brunswick Scientific) à l'obscurité et à 27°C pendant 3 à 4 semaines. Elle est ensuite maintenue dans les conditions données dans le paragraphe suivant.

f. Culture des transformants stables

Les cellules de tabac BY-2 transgéniques sont cultivées sous agitation constante (154 RPM, agitateur New Brunswick Scientific) à l'obscurité et à 27° C. Elles sont repiquées hebdomadairement par transfert de 1 ml de cellules de 7 jours dans 40 ml de milieu MS frais supplémenté de carbénicilline (500 µg/ml) durant 1 mois post-agroinfection et en présence constante d'hygromycine B (113 µg/ml).

4.4 Utilisation des lignées de transformants stables

a. Traitement des cellules transgéniques à la dexaméthasone - induction de la biosynthèse des protéines GFP d'intérêt

La culture de transformants stables, arrivée en phase stationnaire de croissance après 7 jours de culture dans les conditions standard, est repiquée dans les proportions 1 : 4. Elle est aliquotées dans chaque puit (3ml de culture par puit) d'une microplaque (Corning[®] Inc., New York, Etats Unis) à 6 puits (contenance maximale de chaque puit = 16,8 ml). Chaque aliquot (correspondant à 3 ml de milieu de culture) est mis en présence de dexaméthasone 1 à 30 μ M final (la concentration utilisée le plus fréquemment est de 10 μ M) (**Fig.** MM.6). Dans un essai supplémentaire, le même volume de solvant (EtOH et/ou DMSO) est appliqué sur 3 ml de cellules. Les cultures cellulaires traitées sont placées à l'obscurité à 26°C sous agitation constante (140 RPM, agitateur type UNIMAX 1010, Heidolph Instruments, Schwabach, Allemagne) pendant 1 à 48 h. Juste avant l'observation au microscope, 150 μ l de culture cellulaire sont placés entre lame et lamelle. Les cellules positives (exprimant la protéine GFP) sont observées dans un premier temps au microscope à fluorescence classique puis au microscope confocal.

b. Marquage de la membrane plasmique des cellules TBY-2 avec le FM[®]4-64

3 ml de cellules repiquées dans les proportions 1 : 4 sont cultivées dans un puit d'une plaque Elisa (Corning Inc.) en présence de DEX 10 μ M. Après 15 heures de culture (à l'obscurité, 26°C, et agitation continue (140 RPM, agitateur type UNIMAX), 150 μ l de cellules sont prélevées et mises en présence de FM[®] 4-64 (6.7 μ g/ml) (**Fig.** MM.11-a). Les cellules sont

placées entre lame et lamelles et observées au microscope à fluorescence dans les 5 min à 2 heures qui suivent le traitement.

c. Plasmolyse des cellules

Les cellules transgéniques sont induites pendant 15 heures à la DEX 10 μ M et cultivées dans les conditions classiques (¶4.4-a.). 150 μ l de ce milieu de culture sont prélevés et ajoutés à 150 μ l de mannitol 0.45 M. La moitié de ce mélange (150 μ l) est placée entre lame et lamelle. Les cellules sont observées au microscope dans les 30 min qui suivent.

d. Traitement des cellules au triton

Les cellules transgéniques sont induites pendant 15 heures à la DEX 10 μ M et cultivées dans les conditions classiques (¶4.4-a.). Elles sont ensuite mises en présence de 0,05 % de triton X-100 pendant 10 minutes avant d'être observées au microscope confocal

e. Synchronisation simple du cycle cellulaire

Cette méthode est dérivée de celle mise au point par le Professeur Nagata (Nagata *et al.*, 1992).

20 ml d'une suspension cellulaire de 7 jours, en phase stationnaire, sont mis en culture dans 80 ml de milieu MS supplémenté. Sont ajoutés à ce milieu 60 μ l d'une solution d'aphidicholine (à 5 mg/ml dans du DMSO) et de la dexaméthasone (30 μ M final). L'aphidicholine est un inhibiteur des ADN polymérases de type α chez les cellules végétales (Sala *et al.*, 1980). Les cellules sont cultivées 24 h dans les conditions standard ; l'inhibiteur est lavé avec du saccharose 3% et les cellules, remises en culture dans du milieu frais avec de la dexaméthasone (30 μ M). Bloquées par l'aphidicholine en phase G0/G1, les cellules rentrent à nouveau dans le cycle cellulaire (phase S) et sont observées toutes les heures sous microscope à partir de ce temps 0.

f. Traitement des cellules transgéniques avec différents composés : utilisation de l'outiltest

Afin de tester l'effet d'un certain nombre de composés sur la distribution intracellulaire des protéines GFP isoprénylables, il a été nécessaire de mettre au point un protocole particulier. Divisé en cinq étapes majeures, celui-ci est décrit en détail dans le chapitre 1. Brièvement, il comprend le repiquage et la répartition de la culture transgénique dans les puits d'une plaque (Première étape), l'incorporation du composé d'intérêt (Deuxième étape) (**Figures** MM.**7-a**, MM.**8-a**, MM.**10-a**), l'induction (Troisième étape) puis l'analyse des échantillons cellulaires (observations microscopiques, numérisation et dénombrement) (Quatrième étape). Ce protocole a été suivi pour chaque expérience de test de l'effet d'une substance d'intérêt.

g. Expérience de réversion de l'inhibition par incorporation de mévalonate ou d'isoprénols

Les cellules sont traitées 3 heures pré-induction par le ou les inhibiteur(s) métabolique(s) comme décrit précédemment. L'intermédiaire métabolique (mévalonate ou un isoprénol (géraniol, farnésol, géranylgéraniol) est incorporé dans le milieu de culture à une concentration choisie (**Fig.** MM.9). Ce traitement est réalisé au moment de l'ajout de dexaméthasone 10µM.

h. Mise en évidence des mitochondries des cellules TBY-2 – test de viabilité des cellules

La viabilité des cellules TBY-2 transgéniques traitées (ou non) et induites par ajout de dexaméthasone 10 µM est vérifiée *in vivo* par l'observation au microscope confocal des mitochondries cellulaires. 150 µl de cellules inhibées (ou non) et induites sont mis en présence de 0.5 µl MitoTrackerTM (**Fig.** MM.11-a) avant d'être placées entre lame et lamelle. Les TBY-2 sont observées au microscope confocal dans les 5 min qui suivent l'ajout du marqueur.

i. Expériences de statistiques - Technique de comptage des cellules

150 µl de chaque échantillon traité ou non (contrôle) sont déposés entre lame et lamelle. La lame est alors placée sous l'objectif x20 du microscope à fluorescence. Les cellules TBY-2 exprimant la GFP sont observées sous lumière bleue. Elles sont chacune classées dans un groupe particulier dénommé MP, MP+N ou N en fonction de la distribution intracellulaire de la fluorescence émise. Le groupe MP regroupe l'ensemble des cellules dans lesquelles la fluorescence est exclusivement localisée à la membrane plasmique, le groupe MP+N réuni toutes les cellules dans lesquelles la fluorescence est répartie dans le dernier ensemble appelé N, sont classées toutes les cellules ayant une distribution nucléaire de la fluorescence. 200 cellules en moyenne sont observées par échantillon. Les résultats, traduits en pourcentages de cellules ayant une distribution de la fluorescence MP, MP+N ou N, sont reportés dans un tableau (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA, Etats-Unis) afin de créer un histogramme.

j. Quantification de fluorescence

Les images sont acquises au microscope confocal puis importées sous forme d'image TIF grâce au logiciel LSM5 Image Browser. Le niveau de fluorescence est quantifié grâce au logiciel ImageJ version 1.31 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Etats-Unis, http://rsb.info.nih.gov/ij/). Pour cela, les cellules analysées sont numérisées au niveau d'un seul plan focal passant par le nucléole. Pour chaque cellule, agrandie à 200 ou 300%, la fluorescence des structures intra-cellulaires (Vacuole (V), Membrane Plasmique (MP), Noyau (N), et Cytoplasme (Ca)) ainsi que celle du milieu extérieur à la cellule (ME) (le milieu de culture représente le bruit de fond) est mesurée par le logiciel après avoir entouré la surface correspondante. Chaque intensité est ensuite traduite en pourcentages par rapport à l'intensité totale mesurée (somme de chacune des intensités mesurées). Les données, rapportées sous forme de pourcentages, sont traitées et une moyenne est réalisée pour l'ensemble des cellules d'un même traitement. Les résultats sont trduits sous forme d'histogramme (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA, Etats-Unis).

k. Traitement des images obtenues

Les images de microscopie confocale sont obtenues en veillant à ce qu'elles ne soient pas saturées grâce à la fonction « Range indicator » du microscope. Après avoir été importées dans le programme LSM5 Image Browser version 3,1,0,99 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne), elles sont traitées (ajustement du niveau de couleur et du contraste) dans Adobe Photoshop 6 (Adobe Systems, San Jose, CA, Etats-Unis). L'assemblage final est réalisé dans Microsoft Powerpoint (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Etats-Unis).

Annexes

Annexe 1

Définitions

• Isoprénylation : désigne la modification post-traductionnelle d'une protéine possédant un motif C-terminal particulier par une enzyme de type isoprényl transférase qui fixe un ou deux résidus isoprényles sur une ou deux cystéines de ce motif.

• Isoprényler : modifier post-traductionnellement une protéine par isoprénylation.

• **Isoprénylable** : protéine possédant dans sa séquence un motif C-terminal particulier potentiellement modifiable par isoprénylation.

Farnésylation : modification post-traductionnelle d'une protéine par fixation d'un résidu farnésyle sur une cystéine appartenant à un motif C-terminal du type CaaX (où X est une méthionine, sérine, alanine ou glutamine). Cette réaction est catalysée par une farnésyl transférase.

• Farnésyler : modifier post-traductionnellement une protéine par farnésylation.

• Farnésylable : protéine ayant un tétrapeptide CaaX (avec X=M, S, A ou Q) dans sa séquence C-terminale.

 Géranylgéranylation : Il s'agit d'une modification post-traductionnelle d'une protéine possédant un motif C-terminal CaaL (géranylgéranylation de type I) ou XCXC, XXCC ou CCXX (géranylgéranylation de type II). Sur la ou les cystéines de ce motif sera fixé un résidu géranylgéranyle. L'enzyme catalysant cette réaction est une géranylgéranyl transférase.

• Géranylgéranyler : modifier post-traductionnellement une protéine par géranylgéranylation.

• *Géranylgéranylable* : désigne une protéine ayant un motif CaaL, XCXC, XXCC ou CCXX en C-terminal de sa séquence et qui est donc modifiable par géranylgéranylation.
Annexe 2

Abréviations

Abréviations courantes

А	: Absorbance
Aa	: Acide aminé, aminoacide
ABA	: « Abscissic acid», acide abscissique
Acétyl-CoA	: Acétyl-Coenzyme A
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	: Acide désoxyribonucléique génomique
ADP	: Adénosine-5'-diphosphate
AGP	: Protéines arabinogalactanes
APS	: Persulfate d'ammonium
Arf	: « ADP ribosvlation factor »
ARN(s)	: Acide(s) ribonucléique(s)
ARNm	: Acide ribonucléique messager
AS	· Acétosvringone
ATP	· Adénosine-5'-trinhosphate
BET	· Bromure d'éthidium
BP	· « Rand Pass »
BSA	: « Bovine Serum Albumin », sérum albumine bovine
CaMV 35S	: Promoteur responsable de la transcription de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-
	fleur
CBL(s)	: « Calcineurin B-Like protein(s) », protéine(s) de type calcineurine B
CCP	: « Clathrin-coated pit »
CCV	: « Clathrin-coated vesicle », vésicule de clathrine
CDP-ME	: 4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol
CDP-MEP	2-Phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol
Chro	· Chromosomes
CLSM	· « Confocal Laser Scanning Microscopy »
CoA	· Coenzyme A
COPI	· «Coat protein I »
COPII	· « Coat protein II »
Ct	· Partie C-terminale
СТР	· Cytidine-5'-trinhosnhate
CV CV	: Cultivar
	: Désoxyadénosine_5'_trinhosphate
DR	: Demaine Basique
	: Déserventidine 5 ² triphognhate
DEDC	: Desoxycythane-5 - inphosphate
DEV	: Devaméthacone
ACTD	: Décanteurasone
agir	. Desoxyguanosine-5 - impilospilate
DIC	: Contraste internetentiel differentiel de Nomarski
	. Miloli diciliolque
DMAPP	Dimetry any composition
DMSU	Dimetry is unally the 52 trials and at
aNIP	Desoxyribonucleotide-5 -tripnosphate
DO	Densite optique
DUXP	
DsRed2	: «Double-stranded Red Fluorescent Protein 2», proteine rouge fluorescente de type 2
DIE	: 1,4-Dithioerythritol
DIT	: Dithiothreitol
dTTP	: Desoxythymidine-5'-triphosphate
DV	: « Dense vesicle », vésicule dense

DX	: 1-Déoxy-D-xylulose
DXP	: 1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique, éthylène diamine tétraacétate
EF-Hand	: « Elongation Factor-Hand »
EGTA	: Acide glycol éther diamine tétraacétique
Et coll.	: Et collaborateurs
EtOH	: Ethanol
EX	: Excitation
F	: « Forward », désigne un oligonucléotide sens
Fig.	: Figure
FM ^(®) 4-64	: (N-(3-Triéthylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diéthylamino)phényl)hexatriényl)
	pyridinium dibromide)
Fol	: Farnésol
FolF	: Dérivé de farnésol fluorescent
FP	: Farnésyl monophosphate
FPP	: Farnésyl diphosphate
GAP	: « GTPase activating protein », protéine inactivant les GTPases
GAP	: voir GA 3-P
GA 3-P	: D-Glycéraldéhyde 3-phosphate
GDI(s)	: « Guanine nucleotide dissociation inhibitor(s)»
GDP	: Guanosine-5'-diphosphate
GDP-Rop	: Forme Rop liée à la guanosine diphosphate
GEFs	: « Guanine nucleotide exchange factor(s) »
GFP	: « Green Fluorescent Protein », protéine verte fluorescente
GFP-MRC	: « Green Fluorescent Protein »-Manuel Rodríguez-Concencíon
GGol	Géranylgéraniol
GGPP	· Géranylgéranyl diphosphate
Gol	· Géraniol
G3P	voir GA 3-P
GPI	· Glycosylphosphatidylinositol
GPP	· Géranyl diphosphate
GTP	· Guanosine-5'-triphosphate
GTP-Rop	· Forme active de Ron liée à la guanosine triphosphate
GVG	· « Glucocorticoid-inducible transcription factor »
HMG-CoA	· 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A
Hsp	· « Heat shock protein »
IC	· «Insert Coding region »
ІРР	· Isonentényl dinhosnhate
IPTG	· B-D-Isopronyl-thiogalactonyranoside
LB (milieu)	· « Luria Bertani » milieu Luria Bertani pour bactéries
LB	· Frontière gauche de l'ADN-T (« Left T-DNA border »)
LP	· «Long Pass »
LSM	· «Laser Scanning Microscone »
LV	· « Lytic vacuole » vacuole lytique
MARCKS	: « Myristovlated Alanine-Rich C Kinase Substrate » protéine substrat des protéines kinases C
ME-cPP	· ?-C-Méthyl-D-érythritol-? 4-Cyclodinhosphate
MEP	· 2-C-Méthyl-D-érythritol 4-nhosnhate
MES	· Acide 2-Morpholinoéthanesulfonique
Mitot	· MitoTracker®
MS	· Murashige et Skoog
MVA	· Méralonate (acide méralonique)
MVA*	: Mévalonate (deide mévalonque)
MVP	· Mévalonate 5-phosphate
MVPP	· Mévalonate 5-dinhosphate
ND	· Non déterminé
NES	· « Nuclear export signal » signal d'export nucléaire
NLS	· « Nuclear Localization Signal », signal de localisation nucléaire
Nt	· Partie N-terminale
NTP	· Nucléotide-5'- triphosphate
OV	· « Osmotic Vesicle » vésicule osmotique
n	· Page
к.	. 1 450

Р	: Promoteur
PAC	: « Precursor accumulating vesicle »
PAGE	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCR	: « Polymerase Chain Reaction », réaction de polymérisation en chaîne
pcr	: « Partially-coated reticulum »
P.C.V.	: « Packed Cell Volume »
PIPES	: Acide 1.4-Piperazinediéthanesulfonique
PMSF	: Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PNos	· « Nopaline synthetase Promoter » promoteur de la nopaline synthétase
P35S	· « 35S Promoter » promoteur 35S
PSV	· « Protein storage vacuole »
P6xUAS	· «GVG-Regulated promoter »
PVC	· « Pre-vacuolar compartment »
R	: « Reverse » désigne un oligonucléotide antisens
RB	· Frontière droite de l'ADN-T (« Right T-DNA horder »)
REP	: "Rah escort protein », protéine escorte
REP	: « Red Elugrescent Protein », proteine escorte
RFP_SKI	: Red l'horescent l'ioteni », proteine louge nuorescente
Rin - Si R P(s)	: Protéine(s) inactivant les GTPases Rons
RUPOAI (3) RT	: Transcription réverse
	: "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »
SDS	: Neverse Transcriptise-Forymerase Chain Reaction //
SDS-PAGE	: Electronhorèse sur gel de nolvacrylamide-dodécyl sulfate de sodium
sGEP	: « synthetic Green Eluorescent Protein », protéine verte fluorescente de synthèse
SNARE	: « Soluble N ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein recentor »
SWARL	: « Sociale N-ethylinatenniae sensitive factor adaptor protein receptor »
ЗV Т	: "Secretary vesicie", vesicule secretarie
	· I chilliateur
TDV 7	. « I ca 1063-5A polyauchylation sequence »
TDI-2	: « <i>Nicoliuna labacum</i> L. C. Bright Tenow-2», centres de labac Bright Tenow-2
TE	: Tampon Tris EDTA
TE0	· Tallipoli THS-DDTA · · · Dea rbas E0 polyadenylation sequence »
TEMED	· N N N' N' Tétraméthyláthylánadiamine
TCN	. IN, IN, IN - I ettallieuryleuryleuryleurollainine
t Col	. « <i>trans</i> -Goigi network »
	. <i>trans</i> -defailed
	. Format d'une image
I NL Taia	This (herebecome (deal) emission of the second sequence w
I ris	i Iris (nydroxymetnyi) aminometnane
t, t, c-GG0l	: trans, trans, cis-Geranyigeranioi
<i>t,t,c</i> -GGPP	: trans, trans, cis-Geranylgeranyl dipnosphate
t,t-Fol	trans, trans-Farnesol
t,t-FPP	trans, trans-Farnesyl diphosphate
	: I nymidine-5 -tripnosphate
<i>t,t,t</i> -GGol	trans, trans, trans-Geranylgeraniol
<i>t,t,t</i> -GGPP	: trans, trans, trans-Geranyl geranyl diphosphate
U.K.	: « United Kingdom », Angleterre
U.S.A.	: « United States of America », Etats-Unis d'Amérique
UV	: Ultra-Violet
X-gal	: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside/ N,N'-diméthyl-formamide
YEB	: « Yeast extract broth »

Antibiotiques

Amp/Amp ^R	: Ampicilline / Résistance à l'Ampicilline
Carb/Carb ^R	: Carbénicilline / Résistance à la Carbénicilline
Hyg/Hyg ^R	: Hygromycine / Résistance à l'Hygromycine
Kan/Kan ^R	: Kanamycine / Résistance à la Kanamycine
Strepto/Strepto ^R	: Streptomycine / Résistance à la Streptomycine
Tet/Tet ^R	: Tétracycline / Résistance à la Tétracycline

Protéines

AACT	: Acéto-Acétyl-Coenzyme A Thiolase
ADN polymerase	: Polymérase à acide désoxyribonucléique
AP	: Phosphatase alcaline
ATPase	: Adénosine triphosphatase
CaM(s)	: «Calmodulin(s)», Calmoduline(s)
CaM53	: Calmoduline 53 de pétunia
CaM61	: Calmoduline 61 de riz
CCaMK	: Protéine kinase régulée par le complexe Ca ²⁺ /CaM
CDPK(s)	: «Calcium-Dependent Protein Kinase(s)», protéine(s) kinase(s) dépendante
	(s) du calcium
CDP-ME kinase	: voir CMK
CDP-ME synthase	: voir CMS
cMEPP synthase	: voir MCS
СМК	: 4-Diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol kinase
CMS	: 4-Diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol synthase
CMT	: voir CMS
DNase	: Désoxyribonucléase
DOXP synthase	: voir DXS
DXP réductoisomérase	: voir DXR
DXPS	: voir DXS
DXR	: 1-Déoxy-D-Xylulose 5-phosphate Réductoisomérase
DXS	: 1-Déoxy-D-Xylulose 5-phosphate Synthase
FPS	: Farnésyl diphosphate synthase, FPP synthase
FTase, PFT	: Protéine Farnésyl Transférase
GGPS	: Géranylgéranyl diphosphate synthase, GGPP synthase
GGTase, PGGT	: Protéine GéranylGéranyl Transférase
GGTase-I	: GéranylGéranyl Transférase de type I
GGTase-II	: GéranylGéranyl Transférase de type II
GPS	: Géranyl diphosphate synthase. GPP synthase
GTPase : Guanosine triphosphatas	e
HMGR	: 3-Hvdroxy-3-MéthylGlutaryl-Coenzyme A Réductase. HMG-CoA réductase
HMGS	: 3-Hvdroxy-3-MéthylGlutaryl-Coenzyme A Synthase, HMG-CoA synthase
HPT	: «Hygromycin phosphotransferase»
IDI	· Isopentényl diphosphate isomérase IPP isomérase
IDS	· Isopentenyl diphosphate / Diméthylallyl diphosphate synthase IPP/DMAPP
125	synthase
MAP	· Méthionine-amino pentidase
$MCS \rightarrow 2C$ -Méthyl-D-érythritol 2	2 4-cyclodinhosnhate synthase ME-cyclodinhosnhate synthase
MECPS	· voir MCS
MVK	: Mévalonate kinace MVA kinace
NMT	: Muristovil CoA:protéine N muristovil transférase
	Dest fine and a least fine a sech see 1 of the large fine a
PCM	: Proteine prenylcysteine α -carboxyl methyltransferase
PMD	: Mevalonate diphosphate Decarboxylase, MVPP decarboxylase
PMK	: Mévalonate 5-phosphate-kinase, MVP kinase
PMT	: Palmitoyl-CoA : protéine S-palmitoyl transférase
PTase, PPT	: Protéine Prényl Transférase
PTE	: Palmitoyl-thioestérase
Rab-GGTase	: GéranylGéranyl Transférase spécifique des protéines Rab ou GGTase-II
RNAse	: RiboNucléase
Rop	: «Rho-related GTPase(s) from plants», Rho GTPase de plante
Rop6	: Rho GTPase 6 d'Arabidopsis thaliana
SQS	: Squalène Synthase
Taq polymérase	: ADN polymérase extraite de Thermophilus aquaticus
Tgo polymérase	: ADN polymérase extraite de Thermococcus gorgonarius

Inhibiteurs

AC	: Acide chaétomellique A
AP	: Alcool périllique
BFA	: Bréfeldine A
Cit	: Citronellol
CYTD	: Cytochalazine D
FOS	: Fosmidomycine
FTI, FPTI	: « Farnesyl transferase inhibitor », inhibiteur de farnésyl transférase
GGTI	: « Geranylgeranyl transferase inhibitor », inhibiteur de géranylgéranyl transférase
Kéto	: 5-Kétoclomazone
MV	: Mévinoline
ORY	: Oryzaline
SQ	: Squalestatine-1
TAX	: Taxol

Organismes

At	: Arabidopsis thaliana
Dm	: Drosophila melanogaster
Ec, E. coli	: Escherichia coli
Hs	: Homo sapiens
Nt	: Nicotiana tabacum
Os	: Oryza sativa
Ph	: Petunia hybrida
Sc	: Saccharomyces cerevisiae
Та	: Triticum aestivum
Taq	: Thermus aquaticus
Tgo	: Thermococcus gorgonarius

Unités de mesure, préfixes et symboles associés

А	: Ampère	10 ³	kilo	k
°C	: Degré Celsius	10-2	centi	C
Ci	: Curie	10	Centr	C
Da	: Dalton	10-3	milli	m
G	: Gravitation	10-6	mioro	
g	: Gramme	10 *	micro	μ
ĥ	: Heure	10-9	nano	n
hPI	: Heure(s) pré-induction			
hpI	: Heure(s) post-induction			
IC ₅₀	: Concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique			
kb	: Kilo paires de base			
Km	: Constante de Michaelis représentant l'affinité d'une enzyme pour son substrat			
1	: Litre			
М	: Molaire			
m	: Mètre			
μm	: Micron			
min	: Minute			
MM	: Masse Moléculaire			
mol	: Mole			
nm	: Nanomètre			
nt	: Nucléotide			
pb	: Paire de base			
pН	: Potentiel hydrogène			
p/v ou w/v	: Ratio poids/volume ou « weight/volume »			
qsp	: Quantité suffisante pour			
rcf	: « Relative centrifugal force », Force centrifuge relative	ve		
RPM	: Nombre de rotations par minute			
sec	: Seconde			
t	: Temps			

Facteur

Préfixe

Symbole

Tm	: Température de fusion d'un oligonucléotide
U	: Unité
V	: Volt
Vmax	: Vitesse maximale de la réaction
v/v	: Ratio volume/volume
WD	: « Working Distance », distance de travail

Formules et symboles chimiques

^{14}C	: Carbone 14
Ca ²⁺	: Ion calcium
CaCl ₂	: Chlorure de calcium
CO ₂	: Dioxyde de carbone
2,4D	: Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique
FAD^+	: Flavine adénine dinucléotide (forme oxydée)
FADH ₂	: Flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
$^{3}\mathrm{H}$: Tritium
H^+	: Proton
HCl	: Acide chlorhydrique
$H_2O(d)$: Eau (distillée)
H_2O_2	: Peroxyde d'hydrogène
KCl	: Chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	: Dihydrogénophosphate de potassium
KOH	: Hydroxyde de potassium
K _x PO ₄	: Phosphate de x-potassium
Mg^{2+}	: Ion magnésium
MgCl ₂	: Chlorure de magnésium
NaCl	: Chlorure de sodium
Na_2CO_3	: Carbonate de sodium
NAD^+	: Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP ⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NaHCO ₃	: Bicarbonate de sodium
NaOH	: Hydroxide de sodium
-OH	: Groupe hydroxyl
-P	: Groupe phosphate
Pi	: Phosphate inorganique
PPi	: Diphosphate inorganique
Zn^{2+}	: Ion zinc

Symboles

Marque
Déposé
A l'infini
Paragraphe
Pourcentage

Nomenclature génétique

HMGR : Protéine HMGR : Gène

Alphabet grec

α	: Alpha
β	: Beta
γ	: Gamma
λ	: Lambda
μ	: Mu

Acides aminés

A, Ala :	Alanine
C, Cys :	Cystéine
D, Asp :	Acide aspartique
E, Glu :	Acide glutamique
F, Phe :	Phénylalanine
G, Gly :	Glycine
H, His :	Histidine
I, Ile :	Isoleucine
K, Lys :	Lysine
L, Leu :	Leucine
M, Met :	Méthionine
N, Asn :	Asparagine
P, Pro :	Proline
Q, Gln :	Glutamine
R, Arg :	Arginine
S, Ser :	Sérine
T, Thr :	Thréonine
V, Val :	Valine
W, Trp :	Tryptophane
Y, Tyr :	Tyrosine

Biologie cellulaire (voir Fig. Ab)

Ca	: Cytoplasme
CC	: Cytoplasme cortical
Col	: Cytosol
EN	: Enveloppe nucléaire
G, Golgi	: Appareil de Golgi
М	: Mitochondrie
ME	: Milieu extérieur à la cellule
MP	: Membrane plasmique
Ν	: Noyau
Na	: Nucléoplasme
Nol	: Nucléole
Р	: Plaste
PC	: Plaque cellulaire
Pe	: peroxysome
RE	: Réticulum endoplasmique
Тс	: Travée cytoplasmique
V	: Vacuole



Fig. Ab : Une cellule de tabac *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2 (TBY-2) composant un filament. En rouge, la membrane plasmique marquée au FM4-64 délimite la cellule; en vert, la GFP localisée dans le cytosol et le nucléoplasme. La barre blanche représente 10 μm

Annexe 3

Liste des oligonucléotides qui concernent le domaine basique de OsCaM61

Isolement du domaine basique de OsCaM61 Mutation de séquences Sous-clonage des séquences amplifiées dans pGFP-MRC

Nom	Séquence	Tm	Utilisation
RC61F	5'-TACGAG <mark>GAGCTC</mark> GTCAAGTG-3'	63,5	Oligonucléotide sens utilisé pour amplifier la séquence correspondant au domaine C-terminal de la CaM61 (domaine basique-CVIL) par RT-PCR (création d'un site <i>Sac</i> 1); cette séquence a été sous-clonée dans pGFP-MRC
RC61R	5'-TTATTTCTAGATCTTTCAGTGGA-3'	56,5	Oligonucléotide antisens utilisé pour amplifier la séquence correspondant au domaine basique-CVIL de la CaM61 par RT-PCR (création d'un site <i>Xba</i> 1) (avec RC61F); cette séquence a été sous-clonée dans pGFP-MRC
RC61MutR	5'-GCTGTCTAGATTATTACATGATCACGCACTTC-3'	69,5	Oligonucléotide antisens; amplification de la séquence correspondant au domaine basique de la CaM61-CVIL dans le but de créer une mutation ponctuelle Leucine>Méthionine (CVIL>CVIM) (création d'un site <i>Xba</i> 1); permet le sous-clonage dans pGFP-MRC (avec RC61F)
RCCCGR	5'-GCTCTAGATTATTAACCGCAGCACTTCTGGCCAC-3'	76,5	Oligonucléotide antisens employé pour créer un motif de type CCG en C-terminal du domaine basique de la CaM61 (création d'un site Xba1); la séquence du domaine basique-CCG a été sous-clonée dans pGFP-MRC (avec RC61F)
BDSVILR	5'-GCTGTCTAGATTATTACAGGATCACCGACTTC-3'	69,6	Oligonucléotide antisens utilisé pour muter la séquence domaine basique-CVIL en domaine basique-SVIL (création d'un site Xbal); sous-clonage de la séquence amplifiée dans pGFP-MRC (avec RC61F)
BDSVIMR	5'-GCTGTCTAGATTATTACATGATCACCGACTTC-3'	68,7	Oligonucléotide antisens utilisé pour muter le domaine basique-CVIM en domaine basique-SVIM (création d'un site <i>Xba</i> 1); sous clonage dans pGFP-MRC (avec RC61F)
GFP3F	5'-TACCTGAGCACCCAGTCC-3'	61,7	Oligonucléotide sens utilisé pour le séquençage des différents sous-clonages réalisés en C-terminal de la GFP dans pGFP-MRC
GFPR	5'-CACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATC-3'	76	Oligonucléotide antisens utilisé pour le séquençage des sous-clonages réalisés en C-terminal de la GFP dans pGFP- MRC
TERMR	5'-CAACACATGAGCGAAACC-3'	60,6	Oligonucléotide antisens utilisé pour le séquençage des sous-clonages réalisés en C-terminal de la séquence de la GFP dans pGFP-MRC
pGFPAUF	5'-GCATTCTACTTCTATTGCAGC-3'	58,5	Oligonucléotide sens utilisé pour le séquençage en 5' de la GFP

F, « Forward », sens R, « Reverse », antisens Tm, température de fusion de l' oligonucléotide (déterminée grâce au programme trouvé à l'adresse suivante: <u>http://www.dsi.univ-paris5.ft/bio2/OligoTM.html</u>)

En **bleu**, séquence des sites de restriction En **orange**, séquence des codons STOP

Sous-clonage des différentes séquences d'intérêt amplifiées dans pTA 7001

Nom	Séquence	Tm	Utilisation
pGFPXHF	5'-AATTTTCTCGAGTTACGAACGATAGCCATGGTG-3'	74,8	Oligonucléotide sens utilisé pour l'amplification de la séquence de la GFP et des différentes constructions GFP obtenues; création d'un site <i>Xhol</i> en N-terminal de la séquence amplifiée pour le sous-clonage dans pTA7001
pGFPL1R	5'-CTCAGTACTAGTTCAATTATTACAGGATCACGC-3'	67,8	Oligonucléotide antisens utilisé pour l'amplification de la séquence GFP-DBCaM-CVIL qui sera sous- clonée dans pTA 7001 (création d'un site <i>Spe</i> I) (utilisé avec pGFPXHF)
pGFPS1R	5'-ATTGCTACTAGTTTATTACATGATCACGCACTTC-3'	68,6	Oligonucléotide antisens employé pour l'amplification de la séquence GFP-DBCaM-CVIM qui sera sous-clonée dans pTA 7001 (création d'un site <i>Spe</i> I) (utilisé avec pGFPXHF)
SLSp	5'-GGACTAGTTTATTACAGGATCACCGACTTCTGGCC-3'	75	Amplification de la séquence GFP-DBCaM-SVIL en vue d'un sous-clonage dans pTA 7001 (création d'un site <i>Spe</i> I) (avec pGFPXHF)
SMSp	5'-GGACTAGTTTATTACATGATCACCGACTTCTGGCC-3'	74,3	Amplification de la séquence GFP-BDCaM-SVIM et création d'un site <i>Spel</i> pour permettre un sous- clonage dans pTA 7001 (avec pGFPXHF)
pGFPSPR	5'-CCAGATCTGACTAGTGAGCTAGTCCATGCC-3'	72,8	Amplification de la séquence de la GFP en vue d'un sous-clonage dans pTA 7001 (création d'un site <i>Spe</i> I) (avec pGFPXHF)
LBR	5'-TGGCAGGATATATTGTGGTG-3'	61,1	Oligonucléotide antisens utilisé pour vérifier la présence d'un insert dans pTA 7001 (avec 3-AT-3')
3A-T-3'	5'-TTTATTAACTCTTATCCATCCATTTGC-3'	63	S'utilise avec pTAF ou LBR pour vérifier la présence d'un insert dans pTA7001; utilisé aussi pour le séquençage réverse de l'insert
pTAF	5'-TTTGGAGAGGACACGCTGAAGCTAG-3'	70,5	Vérification de la présence d'un insert dans pTA 7001 (avec 3-AT-3'); aussi utilisé pour le séquençage de l'insert
P6UASR	5'-CAGATCCCCGGGTACCGAGCTCG-3'	77	Oligonucléotide antisens (utilisé avec P6UASF) permettant la vérification de la présence du promoteur P6xUAS _{gal4} dans le vecteur pTA 7001
P6UASF	5'-ATTCCTCGAAGCTTGCATGCCGG-3'	75,6	Oligonucléotide sens utilisé avec P6UASR

F, « Forward », sens

R, « Reverse », antisens

Tm, température de fusion de l'oligonucléotide (déterminée grâce au programme trouvé à l'adresse suivante: <u>http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/OligoTM.html</u>)

En **bleu**, séquence des sites de restriction En **orange**, séquences des codons STOP

Liste des oligonucléotides qui concernent AtRop6

Isolement de AtRopó Mutation de séquences Sous-clonage des séquences d'intérêt amplifiées dans pGFP-MRC

Nom	Séquence	Tm	Utilisation
AtRopF	5'-GCAGAGCTCAGTGCTTCAAGGTTTATCAAG-3'	72,5	Isolement de la séquence AtRop6 et création d'un site <i>Sacl</i> pour le sous-clonage en C- terminal de la GFP dans pGFP-MRC
AtRop6R	5'-TCTTCTAGATCTATCAGAGTATAGAACAACCTTTCTGAGATTTTCTC-3'	72,1	Amplification de la séquence AtRop6 et introduction d'un site <i>Scal</i> en vue d'un sous- clonage en C-terminal de la GFP dans pGFP-MRC
GFPScaR	5'-TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG-3'	74,2	Oligonucléotide réverse utilisé avec les oligonucléotides BDRop6F, BDD173F, BDD179F, BDD181F et BDD187F pour l'amplification des derniers aminoacides de AtRop6 en vue d'un sous-clonage entre les sites <i>Sac</i> I et <i>Sca</i> I du vecteur pGFP-MRC en C-terminal de la GFP
BDD187F	5'-CCACCAAAAAACAAGGAGCTCAAGAAGAG-3'	72,4	Amplification des derniers résidus de AtRop6 (création d'un site SacI)
BDD181F	5'-AAGGTCGTTCTCCAGGAGCTCAAAAACAAG-3'	74,2	Amplification des derniers résidus de AtRop6 (création d'un site SacI)
BDD179F	5'-GATGCGGCTATCAAGGTCGAGCTCCAGCCACC-3'	83,5	Amplification des derniers résidus de AtRop6 (création d'un site SacI)
BDD173F	5'-GTGAAAGCAGTGTTTGAGCTCGCTATCAAGG-3'	75,2	Amplification des derniers résidus de AtRop6 (création d'un site SacI)

F, « Forward », sens

R, « Reverse », antisens

Tm, température de fusion de l'oligonucléotide (déterminée grâce au programme trouvé à l'adresse suivante: <u>http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/OligoTM.html</u>)

En **bleu**, séquence des sites de restriction En **orange**, séquence des codons STOP

Sous-clonage des séquences amplifiées dans pTA7001

Nom	Séquence	Tm	Utilisation
RopSpR	5'-CCGCACTAGTGATTTCTACTAGTTCTATCA-3'	65,4	Oligonucléotide antisens permettant l'amplification des différentes séquences des protéines de fusion GFP/Rop6 (création d'un site <i>Spel</i>) en vue d'un sous-clonage dans pTA 7001 (s'utilise avec pGFPXHF)
CMSp6	5'-GGACTAGTCTATCACATTATAGAACAACCTTTCTGAGATTTTCT-3'	71,5	Amplification de la séquence Rop6-BD-CSIM et création d'un site <i>Spel</i> (à utiliser avec pGFPXHF) en vue d'un sous-clonage dans pTA7001
SMSp6	5'-GGACTAGTCTATCACATTATAGAAGAACCTTTCTGAGATTTTCT-3'	71,1	Oligonucléotide permettant l'amplification de la séquence correspondant à Rop6-BD-SSIM (création d'un site <i>Spe</i> I) (avec pGFPXHF) en vue d'un sous-clonage dans le vecteur pTA7001

F, « Forward », sens

R, « Reverse », antisens

Tm, température de fusion de l'oligonucléotide (déterminée grâce au programme trouvé à l'adresse suivante: <u>http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/OligoTM.html</u>) En **bleu**, séquence des sites de restriction En **orange**, séquence des codons STOP Bibliographie

Α

Abo A., Webb M.R., Grogan A., Segal A.W. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.* **298**, 585-591.

Adam K.P., Thiel R., Zapp J. (1999) Incorporation of 1-[1-(13)C]Deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 127-132.

Agrawal G.K., Iwahashi H., Rakwal R. (2003) Small GTPase 'Rop': molecular switch for plant defense responses. *FEBS Lett.* **546**, 173-180.

Alberts A.W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monoghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J. (1980) Mevinolin : a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3957-3961.

<u>Allen G.J., Murata Y., Chu S.P., Nafisi M., Schroeder J.I.</u> (2002) Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant era1-2. *Plant Cell* 14, 1649-1662.

Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J.M., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L., Vance V.B. (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**, 142-144.

Andreeva A.V., Kutuzov M.A., Evans D.E., Hawes C.R. (1998) Proteins involved in membrane transport between the ER and the Golgi apparatus: 21 putative plant homologues revealed by dbEST searching. *Cell Biol. Int.* **22**, 145-160.

Andreeva A.V., Zheng H., Saint-Jore C.M., Kutuzov M.A., Evans D.E., Hawes C.R. (2000) Organization of transport from endoplasmic reticulum to Golgi in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 505-512.

Andres D.A., Seabra M.C., Brown M.S., Armstrong S.A., Smeland T.E., Cremers F.P., Goldstein J.L. (1993) cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. <u>*Cell*</u> 73, 1091-1099.

Antonious G.F. (2000) Clomazone residues in soil and runoff: measurement and mitigation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **64**, 168-175.

Aoyama T. et Chua N.-H. (1997) A glucocorticoïd-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**, 605-612.

Aoyama T., Dong C.H., Wu Y., Carabelli M., Sessa G., Ruberti I., Morelli G., Chua N.H. (1995) Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* **7**, 1773-1785.

Apolloni A., Prior I.A., Lindsay M., Parton R.G., Hancock J.F. (2000) H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2475-2487.

Araki N., Kusumi K., Masamoto K., Niwa Y., Iba K. (2000) Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol. Planta.* **108**, 19-24.

Argenta L.C. et Lopes N.F. (1991) Clomazone effects on pigment accumulation, photosynthetic and respiratory rates of greening soybean seedlings. *R. Bras. Fisiol. Veg.* **3**, 69-74.

Arigoni D., Eisenreich W., Latzel C., Sagner S., Radykewicz T., Zenk M.H., Bacher A. (1999) Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1309-1314.

Arigoni D., Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M.H. (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10600-10605.

Armaleo D., Ye G.N., Klein T.M., Shark K.B., Sanford J.C., Johnston S.A. (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* **17**, 97-103.

Asada T., Sonobe S., Shibaoka H. (1991) Microtubule translocation in the cytokinetic apparatus of cultured tobacco cells. *Nature (Lond.)* **350**, 238-241.

Ashby M.N. (1998) CaaX converting enzymes. Curr. Opin. Lipidol. 9, 99-102.

B_

_

Bach T.J. (1986) Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis ? *Lipids* **21**, 82-88.

Bach T.J., Boronat A., Caelles C., Ferrer A., Weber T., Wettstein A. (1991) Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants. *Lipids* **26**, 637-648.

Bach T.J. et Lichtenthaler H.K. (1982) Mevinolin: a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of radish plants. *Z. Naturforsch.* **37c**, 46-50.

Bach T.J. et Lichtenthaler H.K. (1983a) Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. *Physiol. Plant* **59**, 50-60.

Bach T.J. et Lichtenthaler H.K. (1983b) Mechanisms of inhibition by mevinolin (MK 803) of microsome-bound radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase (EC.1.1.1.34). *Z. Naturforsch.* **38c**, 212-219.

Bach T.J., Rogers D.H., Rudney H. (1986) Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *Eur. J. Biochem.* **154**, 103-111.

Bansal V.S. et Vaidya S. (1994) Characterization of two distinct allyl pyrophosphatase activities from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 393-399.

Barondeau D.P., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D. (2005) Understanding GFP chromophore biosynthesis: controlling backbone cyclization and modifying post-translational chemistry. *Biochem.* 44, 1960-1970.

Bar-Peled M. et Raikhel N.V. (1997) Characterization of AtSEC12 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol.* **114**, 315-324.

Baskin T.I. et Cande W.Z. (1990) The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 277-315.

Basson M.E., Thorsness M., Rine J. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5563-5567.

Batoko H., Zheng H.-Q., Hawes C., Moore I. (2000) A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* **12**, 2201-2218.

Battey N.H. et Blackbourn H.D. (1993) The control of exocytosis in plant cells. New *Phytol.* 125, 307-338.

Battey N.H., James N.C., Greenland A.J., Brownlee C. (1999) Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* **11**, 643-659.

Baxter-Burrell A., Yang Z., Springer P.S., Bailey-Serres J. (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* **296**, 2026-2028.

Bays H.E. (2004) Extended-release niacin/lovastatin: the first combination product for dyslipidemia. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2**, 485-501.

Becerra J. et Lopez-Saez J.F. (1978) Effects of caffeine, calcium and magnesium on plant cytokinesis. *Exp. Cell Res.* **111**, 301-308.

Bednarek S.Y. et Falbel T.G. (2002) Membrane trafficking during plant cytokinesis. *Traffic* **3**, 621-629.

Belanger K.D. et Quatrano R.S. (2000) Membrane recycling occurs during asymmetric tip growth and cell plate formation in *Fucus distichus* zygotes. *Protoplasma* **212**, 24-37.

Bellincampi D. et Morpurgo G. (1991) Stimulation of growth induced by brassinosteroid and conditioning factors in plant-cell cultures. Dans: *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. Cutler H.G., Yokota T., Adam G., eds., Am. Chem. Symp. Ser. **474**, American Chemical Society, Washington DC, 1189-1190.

Bensadoun A. et Weinstein D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.

Bentinger M., Grunler J., Peterson E., Swiezewska E., Dallner G. (1998) Phosphorylation of farnesol in rat liver microsomes: properties of farnesol kinase and farnesyl phosphate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**, 191-198.

Béraud-Dufour S. et Balch W. (2002) Cell science at a glance : a journey through the exocytic pathway. *J. Cell Sci.* **115**, 1779-1780.

Berthelot K., Buret D., Guérin B., Delay D., Negrel J., Delmotte F.M. (1998) Vir-geneinducing activities of hydroxycinnamic acid amides in Agrobacterium tumefaciens. Phytochem. 49, 1537-1548.

Best A., Ahmed S., Kozma R., Lim L. (1996) The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin. *J. Biol. Chem.* 271, 3756-3762.

Betz W.J., Mao F., Smith C.B. (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 365-371.

Biermann B.J., Morehead T.A., Tate S.E., Price J.R., Randall S.K., Crowell D.N. (1994) Novel isoprenylated proteins identified by an expression library screen. *J. Biol. Chem.* **269**, 25251-25254. **Bischoff F., Vahlkamp L., Molendijk A., Palme K.** (2000) Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from *Arabidopsis. Plant Mol. Biol.* **42**, 515-530.

Bischoff K.M. et Rodwell V.W. (1992) Biosynthesis and characterization of (S)-and (R)-3hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **48**, 149-158.

Boevink P., Oparka K., Santa Cruz S., Martin B., Betteridge A., Hawes C. (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* **15**, 441-447.

Böhner S., Lenk I., Rieping M., Herold M., Gatz C. (1999) Technical advance: transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J.* **19**, 87-95.

Bokoch G.M. (1993) Biology of the Rap proteins, members of the ras superfamily of GTPbinding proteins. *Biochem. J.* **289**, 17-24.

Bolte S., Brown S., Satiat-Jeunemaitre B. (2004a) The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rab_{mc} is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. *J. Cell Sci.* **117**, 943-954.

Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D., Satiat-Jeunemaitre B. (2004b) FMdyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.* **214**, 159-173.

Bonner W.M. et Laskey R.A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88.

Borrmann S., Adegnika A.A., Matsiegui P.B., Issifou S., Schindler A., Mawili-Mboumba D.P., Baranek T., Wiesner J., Jomaa H., Kremsner P.G. (2004a) Fosmidomycinclindamycin for *Plasmodium falciparum* Infections in African children. *J. Infect. Dis.* **189**, 901-908.

Borrmann S., Issifou S., Esser G., Adegnika A.A., Ramharter M., Matsiegui P.B., Oyakhirome S., Mawili-Mboumba D.P., Missinou M.A., Kun J.F., Jomaa H., Kremsner P.G. (2004b) Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* **190**, 1534-1540.

Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Backhaus R.A., Camara B. (1998) Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits1. *Plant Physiol.* **117**, 1423-1431.

Boyartchuk V.L., Ashby M.N., Rine J. (1997) Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* **275**, 1796-1800.

Bracha K., Lavy M., Yalovsky S. (2002) The *Arabidopsis* AtSTE24 is a CAAX protease with broad substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 277, 29856-29864.

Breviario D., Morello L., Giani S. (1995) Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* **27**, 953-967.

Brodbeck U. et Bütikofer P. (1994) GPI anchor-hydrolyzing phospholipases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 369-374.

Brown D.C.W., Tian L., Buckley D.J., Lefebvre M., McGrath A., Webb J. (1994) Development of a simple particle bombardment device for gene transfer into plant cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **37**, 47-53.

Buday L. et Downward J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620.

Budziszewski G.J., Lewis S.P., Glower L.W., Reineke J., Jones G., Ziemnik L.S., Lonowski J., Nyfeler B., Aux G., Zhou Q. (2001) *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**, 1765-1778.

Burdett A.S., Stevens M.M., Macmillan D.L. (2001) Laboratory and field studies on the effect of molinate, clomazone, and thiobencarb on nontarget aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2229-2236.

Burgering B.M. et Bos J.L. (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 18-22.

Burke Y.D., Stark M.J., Roach S.L., Sen S.E., Crowell P.L. (1997) Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* **32**, 151-156.

С

Cadwallader K.A., Paterson H., Macdonald S.G., Hancock J.F. (1994) N-terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol. Cell Biol.* **14**, 4722-4730.

Cai G., Moscatelli A., Cresti M. (1997) Cytoskeletal organization and pollen tube growth. *Trends Plant Sci.* **2**, 86-91.

Caldelari D., Sternberg H., Rodríguez-Concepción M., Gruissem W., Yalovsky S. (2001) Efficient prenylation by a plant geranylgeranyl-transferase-I requires a functional CaaL box motif and a proximal polybasic domain. *Plant Physiol.* **126**, 1416-1429.

Calero M., Chen C.Z., Zhu W., Winand N., Havas K.A., Gilbert P.M., Burd C.G., Collins R.N. (2003) Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1852-1867.

Caron J.M. (1997) Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. *In vivo* and cell-free studies. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 621-636.

Casey P.J. et Seabra M.C. (1996) Protein prenyltransferases. J. Biol. Chem. 271, 5289-5292.

Casey P.J., Solski P.A., Der C.J., Buss J.E. (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 8323-8327.

<u>Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C.</u> (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

Chan K.K., Oza A.M., Siu L.L. (2003) The statins as anticancer agents. *Clin. Cancer Res.* 9, 10-19.

Chang J.H. (1983) Herbicidal 3-isoxazolidinones and hydroxamic acids. United States Patent 4,405,357.

Chang J.H., Konz M., Aly E.A., Sticker R.E., Wilson K.R., Krog N.E., Dickinson P.R. (1987) 3-Isoxazolidinones and related compounds. A new class of herbicides. Synthesis and Chemistry of Agrochemicals, Baker D.R., ACS Symposium series 355. American Chemical Society, Washington DC, S. 10-23.

Chappell J. (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **46**, 521-547.

Chappell J. (2002) The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **5**, 151-157.

Charon L., Hoeffler J.-F., Pale-Grosdemange C., Lois L.-M., Campos N., Boronat A., Rohmer M. (2000) Deuterium-labelled isotopomers of 2-*C*-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem. J.* **346**, 737-742.

Chary S.N., Bultema R.L., Packard C.E., Crowell D.N. (2002) Prenylcysteine α-carboxyl methyltransferase expression and function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **32**, 735-747.

Chen Z., Otto J.C., Bergo M.O., Young S.G., Casey P.J. (2000) The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *J. Biol. Chem.* **275**, 41251-41257.

Cheng S.H., Willmann M.R., Chen H.C., Sheen J. (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**, 469-485.

Cherniack A.D., **Klarlund J.K.**, **Conway B.R.**, **Czech M.P.** (1995) Disassembly of Son-ofsevenless proteins from Grb2 during p21ras desensitization by insulin. *J. Biol. Chem.* **270**, 1485-1488.

Cheung A.Y., Chen C.Y., Glaven R.H., De Graaf B.H., Vidali L., Hepler P.K., Wu H.-M. (2002) Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important for pollen tube growth. *Plant Cell* **14**, 945-962.

Chiu V.K., Bivona T., Hach A., Sajous J.B., Silletti J., Wiener H., Johnson R.L. 2nd, Cox A.D., Philips M.R. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* **4**, 343-350.

Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* **6**, 325-330.

Choy E., Chiu V.K., Silletti J., Feoktistov M., Morimoto T., Michaelson D., Ivanov I.E., Philips M.R. (1999) Endomembrane trafficking of Ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**, 69-80.

Chung W.S., Lee S.H., Kim J.C., Heo W.D., Kim M.C., Park C.Y., Park H.C., Lim C.O., Kim W.B., Harper J.F., Cho M.J. (2000) Identification of a calmodulin-regulated soybean Ca²⁺-ATPase (SCA1) that is located in the plasma membrane. *Plant Cell* **12**, 1393-1407.

Clark G.J., Kinch M.S., Rogers-Graham K., Sebti S.M., Hamilton A.D., Der C.J. (1997) The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *J. Biol. Chem.* **272**, 10608-10615.

Clarke P.R. et Hardie D.G. (1990) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase *in vitro* and in intact rat liver. *EMBO J.* **9**, 2439-2446.

Clarke S. (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 355-386.

Cleary A.L., Gunning B.S., Wasteneys G.O., Hepler P.K. (1992) Microtubules and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Cell Sci.* **103**, 977-988.

Cokol M., Nair R., Rost B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* **1**, 411-415.

Cole N.B. et Lippincott-Schwartz J. (1995) Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 55-64.

Collinge M. et Trewavas A.J. (1989) The location of calmodulin in the pea plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264**, 8865-8872.

Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**, 10881-10890.

Corsini A., Mazzotti M., Raiteri M., Soma M.R., Gabbiani G., Fumagalli R., Paoletti R. (1993) Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation: *in vitro* studies with inhibitors of HMG-CoA reductase. *Atherosclerosis* **101**, 117-125.

Cox A.D., Garcia A.M., Westwick J.K., Kowalczyk J.J., Lewis M.D., Brenner D.A., Der C.J. (1994) The CAAX peptidomimetic compound B581 specifically blocks farnesylated, but not geranylgeranylated or myristylated, oncogenic ras signaling and transformation. *J. Biol. Chem.* **269**, 19203-19206.

Craighead M.W., Bowden S., Watson R., Armstrong J. (1993) Function of the ypt2 gene in the exocytic pathway of *Schizosaccharomyces pombe. Mol. Biol. Cell* **4**, 1069-1076.

Crick D.C., Andres D.A., Danesi R., Macchia M., Waechter C.J. (1998) Geranylgeraniol overcomes the block of cell proliferation by lovastatin in C6 glioma cells. *J. Neurochem.* **70**, 2397-2405.

Crick D.C., Andres D.A., Waechter C.J. (1995) Farnesol is utilized for protein isoprenylation and the biosynthesis of cholesterol in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 590-599.

Crick D.C., Andres D.A., Waechter C.J. (1997a) Geranylgeraniol promotes entry of UT-2 cells into the cell cycle in the absence of mevalonate. *Exp. Cell. Res.* **231**, 302-307.

Crick D.C., Andres D.A., Waechter C.J. (1997b) Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 483-487.

Crick D.C., Waechter C.J., Andres D.A. (1994) Utilization of geranylgeraniol for protein isoprenylation in C6 glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 955-961.

Crick D.C., Waechter C.J., Andres D.A. (1996) Geranylgeraniol restores cell proliferation to lovastatin treated C6 glial cells. *S.A.A.S. Bull. Biochem. Biotechnol.* **9**, 37-42.

Criqui MC, **Parmentier Y**, **Derevier A**, **Shen WH**, **Dong A**, **Genschik P**. (2000) Cell cycledependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant J*. **24**, 763-773.

Croteau R. (1992) Clomazone does not inhibit the conversion of isopentenyl pyrophosphate to geranyl, farnesyl, or geranylgeranyl pyrophosphate *in vitro*. *Plant Physiol*. **98**, 1515-1517.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites). Buchanan B., Gruissem W., Jones R., eds, Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of plant biologists, Rockville, MD, 1250-1268.

Crowell D.N. (2000) Functional implications of protein isoprenylation in plants. *Prog. Lipid Res.* **39**, 393-408.

Crowell D.N. et Kennedy M. (2001) Identification and functional expression in yeast of a prenylcysteine alpha-carboxyl methyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **45**, 469-476.

Crowell D.N. et Salaz M.S. (1992) Inhibition of growth of cultured tobacco cells at low concentrations of lovastatin is reversed by cytokinin. *Plant Physiol.* **100**, 2090-2095.

Crowell D.N., Sen S.E., Randall S.K. (1998) Prenylcysteine α-carboxyl methyltransferase in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **118**, 115-123.

Cutler S., Ghassemian M., Bonetta D., Cooney S., McCourt P. (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis. Science* **273**, 1239-1241.

Cvejic J.H. et Rohmer M. (2000) CO2 as main carbon source for isoprenoid biosynthesis *via* the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochem.* **53**, 21-28.

D_

Dai Q., Choy E., Chi V., Romano J., Slivka S.R., Steitz S.A., Michaelis S., Philips M.R. (1998) Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **273**, 15030-15034.

Davignon J. et Laaksonen R. (1999) Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 543-559.

De Block M. (1993) The cell biology of plant transformation: current states, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica* **71**, 1-14.

Delagrave S., Hawtin R.E., Silva C.M., Yang M.M., Youvan D.C. (1995) Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Biotechnology (N Y)* **13**, 151-154.

Desnoyers L., Anant J.S., Seabra M.C. (1996) Geranylgeranylation of Rab proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 699-703.

Desnoyers L. et Seabra M.C. (1998) Single prenyl-binding site on protein prenyl transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12266-12270.

Didichenko S.A. et Thelen M. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase c2alpha contains a nuclear localization sequence and associates with nuclear speckles. *J. Biol. Chem.* **276**, 48135-48142.

Dikstein R., Ruppert S., Tjian R. (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell* **84**, 781-790.

Dixit R. et Cyr R. (2002) Golgi secretion is not required for marking the preprophase band site in cultured tobacco cells. *Plant J.* **29**, 99-108.

Dolence J.M. et Poulter D. (1995) A mechanism for posttranslational modification of proteins by yeast protein farnesyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5008-5011.

Dong A., Xin H., Yu Y., Sun C., Cao K., Shen W.-H. (2002) The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform, OsCaM61, depends on its prenylation status. *Plant Mol. Biol.* **48**, 203-210.

Driouich A., Zhang G.F., Staehelin L.A. (1993) Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* **101**, 1363-1373.

Dubey V.S. (2002) Mevalonate-independent pathway of isoprenoids synthesis: a potential target in some human pathogens. *Curr. Sci.* **83**, 685-688.

Duke S.O. et Kenyon W.H. (1988) Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development. II. Pigment synthesis and photosynthetic function in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) primary leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 11-18.

Duke S.O. et Paul R.N. (1986) Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development. I. Ultrastructural effects in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) primary leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 1-10.

Duncan J.A. et Gilman A.G. (1998) A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J. Biol. Chem.* **273**, 15830-15837.

Dunphy J.T., Greentree W.K., Manahan C.L., Linder M.E. (1996) G-protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 7154-7159.

Dunphy J.T. et Linder M.E. (1998) Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 245-261.

Dunten P., Kammlott U., Crowther R., Weber D., Palermo R., Birktoft J. (1998) Protein farnesyltransferase: structure and implications for substrate binding. *Biochemistry* **37**, 7907-7912.

Duronio R.J., Reed S.I., Gordon J.I. (1992) Mutations of human myristoyl-CoA:protein Nmyristoyltransferase cause temperature-sensitive myristic acid auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4129-4133.

Duronio R.J., Towler D.A., Heuckeroth R.O., Gordon J.I. (1989) Disruption of the yeast N-myristoyl transferase gene causes recessive lethality. *Science* **243**, 796-800.

Dykema P.E., Sipes P.R., Marie A., Biermann B.J., Crowell D.N., Randall S.K. (1999) A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Mol. Biol.* **41**, 139-150.

E_

Eisenhaber B., Wildpaner M., Schultz C.J., Borner G.H.H., Dupree P., Eisenhaber F. (2003) Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **133**, 1691-1701.

Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk M.H., Bacher A. (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* **5**, 221-233. **Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A.** (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84.

Ellard-Ivey M., **Hopkins R.B**., **White T.J**., **Lomax T.L**. (1999) Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo L.*). *Plant Mol. Biol.* **39**, 199-208.

ElNaggar S.F., Creekmore R.W., Schocken M.J., Rosen R.T., Robinson R.A. (1992) Metabolism of clomazone herbicide in soybean. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 880-883.

Emans N., Zimmermann S., Fischer R. (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* **14**, 71-86.

Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005-1016.

Endo A. (1985) Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterollowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J. Med. Chem.* **28**, 401-405.

Endo A., Hasumi K., Yamada A., Shimoda R., Takeshima H. (1986) The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. *J. Antibiot. (Tokyo)* **39**, 1609-1610.

Englund P.T. (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 121-138.

Enjuto M., Balcells L., Campos N, Caelles C., Arro M., Boronat A. (1994) *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 927-931.

Epstein W.W., Lever D., Leining L.M., Bruenger E., Rilling H.C. (1991) Quantitation of prenylcysteines by a selective cleavage reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9668-9670.

Essl D., Dirnberger D., Gomord V., Strasser R., Faye L., Glössl J., Steinkellner H. (1999) The N-terminal 77 amino acids from tobacco *N*-acetylglucosaminyl transferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of *Nicotiana benthamiana* cells. *FEBS Lett.* **453**, 169-173. **Estévez J.M., Cantero A., Reindl A., Reichler S., León P** (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **25**, 22901-22909.

Estruch J.J., Kadwell S., Merlin E., Crossland L. (1994) Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8837-8841.

Euteneuer U., Jackson W.T., McIntosh J.R. (1982) Polarity of spindle microtubules in *Haemanthus* endosperm. *J. Cell Biol.* **94**, 644-653.

F_

_

Falconer M.M. et Seagull R.W. (1985) Xylogenesis in tissue culture: taxol effects on microtubule reorientation and lateral association in differentiating cells. *Protoplasma* **128**, 157-166.

Farh L., Mitchell D.A., Deschenes R.J. (1995) Farnesylation and proteolysis are sequential, but distinct steps in the CaaX box modification pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 113-121.

Farnsworth C.C., Gelb M.H., Glomset J.A. (1990) Identification of geranylgeranylmodified proteins in HeLa cells. *Science* **247**, 320-322.

Farnsworth C.C., Seabra M.C., Ericsson L.H., Gelb M.H., Glomset J.A. (1994) Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11963-11967.

Farnsworth C.C., Wolda S.L., Gelb M.H., Glomset J.A. (1989) Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **264**, 20422-20429.

Farrell F.X., Yamamoto K., Lapetina E.G. (1993) Prenyl group identification of rap2 proteins: a ras superfamily member other than ras that is farnesylated. *Biochem. J.* **289**, 349-355.

Feldherr C.M., Kallenbach E., Schultz N. (1984) Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. J. Cell Biol. 99, 2216-2222.

Ferguson M.A.J. (1994) What can GPI do for you? Parasitol. Today 10, 48-52.

Ferguson M.A.J., Homans S.W., Dwek R.A., Rademacher T.W. (1988) Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* **239**, 753-759. **Ferguson M.A.J. et Williams A.F.** (1988) Cell-surface anchoring of proteins *via* glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 285-320.

Ferguson M.A. (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10673-10675.

Finegold A.A., Johnson D.I., Farnsworth C.C., Gelb M.H., Judd S.R., Glomset J.A., Tamanoi F. (1991) Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the CDC43 gene product but not the DPR1 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 4448-4452.

Finer J.J., Vain P., Jones M.W., McMullen M.D. (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell. Rep.* **11**, 323-328.

Finn B.E. et Forsen S. (1995) The evolving model of calmodulin structure, function and activation. *Structure* **3**, 7-11.

Fischer-Parton S., Parton R.M., Hickey P.C., Dijksterhuis J., Atkinson H.A., Read N.D. (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal *hyphae. J. Microsc.* **198**, 246-259.

Fischer T.H., Gatling M.N., McCormick F., Duffy C.M., White G.C. 2nd (1994) Incorporation of Rap 1b into the platelet cytoskeleton is dependent on thrombin activation and extracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 269, 17257-17261.

Flanagan M.D. et Lin S. (1980) Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* **255**, 835-838.

Flesch G. et Rohmer M. (1988) Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopan skeleton. *Eur. J. Biochem.* 175, 405-411.

Fliesler S.J. et Keller R.K. (1995) Metabolism of [3H]farnesol to cholesterol and cholesterogenic intermediates in the living rat eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 695-702.

Foster R., Hu K.Q., Lu Y., Nolan K.M., Thissen J., Settleman J. (1996) Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2689-2699.

Fraichard A., Perotti E., Gavin O., Chanson A. (1996) Subcellular localization, distribution and expression of calmodulin in *Zea mays* roots. *Plant Sci.* **118**, 157-165.

Freije J.M., Blay P., Pendas A.M., Cadinanos J., Crespo P., Lopez-Otin C. (1999) Identification and chromosomal location of two human genes encoding enzymes potentially involved in proteolytic maturation of farnesylated proteins. Genomics 58, 270-280.

Frigerio L., De Virgilio M., Prada A., Faoro F., Vitale A. (1998) Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. *Plant Cell* **10**, 1031-1042.

Fujimura-Kamada K., Nouvet F.J., Michaelis S. (1997) A novel membrane-associated metalloprotease, Ste24p, is required for the first step of NH2-terminal processing of the yeast a-factor precursor. *J.Cell Biol.* **136**, 271-285.

Fukada Y., Matsuda T., Kokame K., Takao T., Shimonishi Y., Akino T., Yoshizawa T. (1994) Effects of carboxyl methylation of photoreceptor G protein gamma-subunit in visual transduction. *J. Biol. Chem.* **269**, 5163-5170.

Fulda M., Heinz E., Wolter F.P. (1997) *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol. Biol.* **33**, 911-922.

Fullner K.J. et Nester E.W. (1996) Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens. J. of Bacteriology* **178**, 1498-1504.

Furfine E.S., Leban J.J., Landavazo A., Moomaw J.F., Casey P.J. (1995) Protein farnesyltransferase: kinetics of farnesyl pyrophosphate binding and product release. *Biochemistry* **34**, 6857-6862.

Furukawa Y., Tsukamoto K., Ikezawa H. (1997) Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5'-nucléotidase for GPI anchoring: a study of the hydrophilic spacer region. *Biochim. Biophys. Acta* **1328**, 185-196.

Fu Y.H. et Marzluf G.A. (1990) cys-3, the positive-acting sulfur regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 11942-11947.

Fu Y., Li H., Yang Z. (2002) The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine Factin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *Plant Cell* **14**, 777-794.

Fu Y., Wu G., Yang Z. (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J. Cell Biol.* **152**, 1019-1032.



<u>Galichet A.</u> et <u>Gruissem W</u>. (2003) Protein farnesylation in plants-conserved mechanisms but different targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 530-535.

Gao X., Satoh T., Liao Y., Song C., Hu C.-D., Kariya Ki K., Kataoka T. (2001) Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras. *J. Biol. Chem.* **276**, 42219-42225.

Garcia A.M., Rowell C., Ackermann K., Kowalczyk J.J., Lewis M.D. (1993) Peptidomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 18415-18418.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press*, 571-607.

Gatz C. et Lenk I. (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci.* **3**, 352-358.

Gerber L.D., Kodukula K., Udenfriend S. (1992) Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. J. Biol. Chem. 267, 12168-12173.

Gilchrist J.S.C., Czubryt M.P., Pierce G.N. (1994) Calcium and calcium-binding proteins in the nucleus. *Mol. Cell. Biochem.* **135**, 79-88.

Giner J.L., Jaun B., Arigoni D. (1998) Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: the fate of the 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **17**,1857-1858.

Glomset J.A. et Farnsworth C.C. (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**, 181-205.

<u>Glover C.J.</u> et <u>Felsted R.L.</u> (1995) Identification and characterization of multiple forms of bovine brain N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 23226-23233.

Goddard R.H., Wick S.M., Silflow C.D., Snustad D.P. (1994) Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol.* **104**, 1-6.

Goldstein J.L. et Brown M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430.

<u>Goodwin J.S.</u>, <u>Drake K.R.</u>, <u>Rogers C.</u>, <u>Wright L.</u>, <u>Lippincott-Schwartz J.</u>, <u>Philips M.R.</u>, <u>Kenworthy A.K.</u> (2005) Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex *via* a nonvesicular pathway. J. Cell Biol. 170, 261-272.

Görlich D. et Mattaj I.W. (1996) Nucleocytoplasmic transport. Science 271, 1513-1518.

Gosser Y.Q., Nomanbhoy T.K., Aghazadeh B., Manor D., Combs C., Cerione R.A., Rosen M.K. (1997) C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* **387**, 814-819.

Goud B., Salminen A., Walworth N.C., Novick P.J. (1988) A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* **53**, 753-768.

Gutierrez L., Magee A.I., Marshall C.J., Hancock J.F. (1989) Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J.* **8**, 1093-1098.

Gu X. et Verma D.P.S. (1996) Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J.* **15**, 695-704.

Gu X. et Verma D.P.S. (1997) Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell* **9**, 157-169.

Gu Y., Wang Z., Yang Z. (2004) ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 527-536.

Н_____

Haas J., Park E.-C., Seed B. (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* 6, 315-324.

Hahn F.M., Hurlburt A.P., Poulter C.D. (1999) *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **181**, 4499-4504.

Hancock J.F., Cadwallader K., Marshall C.J. (1991a) Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO J.* **10**, 641-646.

Hancock J.F., Cadwallader K., Paterson H., Marshall C.J. (1991b) A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* **10**, 4033-4039.

Hancock J.F. et Hall A. (1993) A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J.* **12**, 1915-1921.

Hancock J.F., Paterson H., Marshall C.J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**, 133-139.

Harmon A.C., Gribskov M., Harper J.F. (2000) CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci.* **5**, 154-159.

Hartmann M.A. et Bach T.J. (2001) Incorporation of all-trans-farnesol into sterols and ubiquinone in Nicotiana tabacul L. cv Bright Yellow-2 cell cultures. *Tetrahedron Lett.* **42**, 655-657.

Hartmann M.A., Wentzinger L., Hemmerlin A., Bach T.J. (2000) Metabolism of farnesyl diphosphate in tobacco BY-2 cells treated with squalestatin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 794-796.

Hashizume T., Matsubara S., Endo A. (1983) Compactin (ML-236B) as a new growth inhibitor of plant callus. *Agric. Biol. Chem.* 47, 1401-1403.

Hata S., Takagishi H., Kouchi H. (1987) Variation in the content and composition of sterols in alfalfa seedlings treated with compactin (ML-236B) and mevalonic acid. *Plant Cell Physiol.* 28, 709-714.

Haudenschild C. (1995) Rôle des stérols au cours de l'élicitation de la synthèse des phytoalexines dans des suspensions cellulaires végétales. *Thèse de Doctorat d'Etat. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.*

Hawes C.R., Brandizzi F., Andreeva A.V. (1999) Endomembranes and vesicle trafficking. *Current Opinion in plant Biology* **2**, 454-461.

Hayashi M., Toriyama K., Kondo M., Hara-Nishimura I., Nishimura M. (1999) Accumulation of a fusion protein containing 2S albumin induces novel vesicles in vegetative cells of *Arabidopsis*. *Plant Cell. Physiol.* **40**, 263-272.

He B., Chen P., Chen S.Y., Vancura K.L., Michaelis S., Powers S. (1991) RAM2, an essential gene of yeast, and RAM1 encode the two polypeptide components of the farnesyltransferase that prenylates a-factor and Ras proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11373-11377.

Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.

Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12501-12504.

Heiser W. (1995) Optimization of Biolistic[®] transformation using the helium-driven PDS-1000/He system. *Bio-Rad, Bulletin 1688*.

Hemmerlin A. (1997) Etude du rôle de molécules d'origine isoprénique (dérivées du mévalonate) dans la régulation du cycle cellulaire d'une suspension de cellules *Nicotiana tabacum Bright Yellow 2* (TBY-2). *Thèse de Doctorat d'Etat. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.*

Hemmerlin A. et Bach T.J. (1998) Effects of mevinolin on cell cycle progression and viability of tobacco BY-2 cells. *Plant J.* **14**, 65-74.

Hemmerlin A. et Bach T.J. (2000) Farnesol-induced cell death and stimulation of 3hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in tobacco cv Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **123**, 1257-1268.

Hemmerlin A., Gerber E., Feldtrauer J.F., Wentzinger L., Hartmann M.A., Tritsch D., Hoeffler J.F., Rohmer M., Bach T.J. (2004) A review of tobacco BY-2 cells as an excellent system to study the synthesis and function of sterols and other isoprenoids. *Lipids* **39**, 723-735.

Hemmerlin A., Hoeffler J.-F., Meyer O., Tritsch D., Kagan I.A., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., Bach T.J. (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phophate pathways in tobacco Bright Yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* **29**, 26666-26676.

Hepler P.K. (1982) Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* 111, 121-133.

Hepler P.K. et Bonsignore C.L. (1990) Caffeine inhibition of cytokinesis: ultrastructure of cell plate formation/degradation. *Protoplasma* 157, 182-192.

Heuser J., Zhu Q., Clarke M. (1993) Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium amoebae. J. Cell Biol.* **121**, 1311-1327.

Hirayama T. et Oka A. (1992) Novel protein kinase of *Arabidopsis thaliana* (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine and threonine. *Plant Mol. Biol.* **20**, 653-662.

Hoeffler J.F., Hemmerlin A., Grosdemange-Billiard C., Bach T.J., Rohmer M. (2002) Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Biochem. J.* 366, 573-583. **Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A.** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Tiplasmid. *Nature* **303**, 179-180.

Hoessli D.C. et <u>Robinson P.J.</u> (1998) GPI-anchors and cell membranes: a special relationship. *Trends Cell. Biol.* **8**, 87-89.

Hoffman G.R., Nassar N., Cerione R. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**, 345-356.

Hoffmann J. et Mendgen K. (1998) Endocytosis and membrane turnover in the germ tube of *Uromyces fabae*. *Fungal Genet.Biol.* **24**, 77-85.

Hofmann K. et Stoffel W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 166.

Hohl R.J. et Lewis K. (1995) Differential effects of monoterpenes and lovastatin on RAS processing. *J. Biol. Chem.* **270**, 17508-17512.

Holstein S.A., Wohlford-Lenane C.L., Hohl R.J. (2002) Consequences of mevalonate depletion: differential transcriptional, translational, and post-translational up-regulation of Ras, Rap1a, RhoA and RhoB. *J. Biol. Chem.* **277**,10678-10682.

Holstein S.A., Wohlford-Lenane C.L., Hohl R.J. (2002) Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins. *Biochemistry* **41**, 13698-13740.

Hong B., Ichida A., Wang Y., Gens J.S., Pickard B.G., Harper J.F. (1999) Identification of a calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase in the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **119**, 1165-1176.

Hong Y., Takano M., Liu C.M., Gasch A., Chye M.L., Chua N.H. (1996) Expression of three members of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **30**, 1259-1275.

Hooley R. (1999) A role for G proteins in plant hormone signalling ? *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 393-402.

Hopfner K.P., Eichinger A., Engh R.A., Laue F., Ankenbauer W., Huber R., Angerer B. (1999) Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3600-3605.

Hrabak E.M., Dickmann L.J., Satterlee J.S., Sussman M.R. (1996) Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **31**, 405-412.

Hrycyna C.A. et Clarke S. (1990) Farnesyl cysteine C-terminal methyltransferase activity is dependent upon the STE14 gene product in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5071-5076.

Hrycyna C.A., Sapperstein S.K., Clarke S., Michaelis S. (1991) The Saccharomyces cerevisiae STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *EMBO J.*10, 1699-1709.

Huber L.A., Pimplikar S., Parton R.G., Virta H., Zerial M., Simons K. (1993) Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J. Cell Biol.* **123**, 35-45.

Hugdahl J. et Morejohn L. (1993) Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **102**, 725-740.

Hunold R., Bronner R., Hahne G. (1994) Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *Plant J.* **5**, 593-604.

Hunold R., Burrus M., Bronner R., Duret J.-P., Hahne G. (1995) Transient gene expression in sunflower (*Helianthus annuus* L.) following microprojectile bombardment. *Plant Sci.* **105**, 95-109.

I_____

_

Ikezawa H. (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 409-417.

Inaba T., Nagano Y., Nagasaki T., Sasaki Y. (2002) Distinct localization of two closely related Ypt3/Rab11 proteins on the trafficking pathway in higher plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 9183-9188.

Inoue H., Korenaga T., Sagami H., Koyama T., Ogura K. (1994) Phosphorylation of farnesol by a cell-free system from *Botryococcus braunii. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1036-1041.

Istvan E.S. et Deisenhofer J. (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292, 1160-1164.

J__

Jackson C.L. et Casanova J.E. (2000) Turning on ARF: the Sec7 family of guaninenucleotide-exchange factors. *Trends Cell. Biol.* **10**, 60-67.

Jackson J.H., Li J.W., Buss J.E., Der C.J., Cochrane C.G. (1994) Polylysine domain of K-ras 4B protein is crucial for malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12730-12734.

James G.L., Goldstein J.L., Brown M.S. (1995) Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic *in vitro. J. Biol. Chem.* **270**, 6221-6226.

Jarrett H.W., Brown C.J., Black C.C., Cormier M.J. (1982) Evidence that calmodulin is in the chloroplast of peas and serves a regulatory role in photosynthesis. *J. Biol. Chem.* **257**, 13795-13804.

John J., Rensland H., Schlichting I., Vetter I., Borasio G.D., Goody R.S., Wittinghofer A. (1993) Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J. Biol. Chem.* **268**, 923-929.

Johnston S.R. (2001) Farnesyl transferase inhibitors: a novel targeted therapy for cancer. *Lancet Oncol.* **2**, 18-26.

Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H.K., Soldati D., Beck E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573-1576.

Jones M.A., Shen J.J., Fu Y., Li H., Yang Z., Grierson C.S. (2002) The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* **14**, 763-776.

Jones M.G. et Payne H.L. (1978) Cytokinesis in *Impatiens balsamina* and the effect of caffeine. <u>Cytobios</u>. **20**, 79-91.

Julliard J.H. et Douce R. (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 2042-2045.

Jurgens G. et Geldner N. (2002) Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic* **3**, 605-613.
K_

Kakimoto T. et Shibaoka H. (1988) Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma* **2**(Suppl.), 95-103.

Kamata M. et Aida Y. (2000) Two putative alpha-helical domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediate nuclear localization by at least two mechanisms. *J. Virol.* **74**, 7179-7186.

Kammerer S., Arnold N., Gutensohn W., Mewes H.W., Kunau W.H., Hofler G., Roscher A.A., Braun A. (1997) Genomic organization and molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein. *Genomics* **45**, 200-210.

Kamuro Y., Kawai T., Kakiuchi T., inventors. 26 mars 1991. Herbicidal methods and compositions comprising fosmidomycin. Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., U.S. Patent Application No. 5,002,602.

Kanaan M.N., Fu Y.H., Marzluf G.A. (1992) The DNA-binding domain of the Cys-3 regulatory protein of *Neurospora crassa* is bipartite. *Biochemistry* **31**, 3197-3203.

Kasahara H., Hanada A., Kuzuyama T., Takagi M., Kamiya Y., Yamaguchi S. (2002) Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 277, 45188-45194.

Kato K., Matsumoto T., Koiwai S., Mizusaki S., Nishida K., Nogushi M., Tamaki E. (1972) Liquid suspension culture of tobacco cells. *Dans* G. Terui, ed., *Ferment Technology Today*. Society of Fermentation Technology, Osaka, 689-695.

Kawasaki T., Hayashida N., Baba T., Shinozaki K., Shimada H. (1993) The gene encoding a calcium-dependent protein kinase located near the sbe1 gene encoding starch branching enzyme I is specifically expressed in developing rice seeds. *Gene* **129**, 183-189.

Kawasaki T., Henmi K., Ono E., Hatakeyama S., Iwano M., Satoh H., Shimamoto K. (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10922-10926.

Keddie J.S., Carroll B.J., Thomas C.M., Reyes M.E., Klimyuk V., Holtan H., Gruissem W., Jones J.D. (1998) Transposon tagging of the Defective embryo and meristems gene of tomato. *Plant Cell* **10**, 877-888.

Kemp L.E., Bond C.S., Hunter W.N. (2001) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant *Escherichia coli* 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthetase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **57**, 1189-1191.

Kemp L.E., Bond C.S., Hunter W.N. (2002) Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4cyclodiphosphate synthase: an essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6591-6596.

Keohavong P. et Thilly W.G. (1989) Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9253-9257.

Kepes F., Rambourg A., Satiat-Jeunemaitre B. (2005) Morphodynamics of the secretory pathway. *Int. Rev. Cytol.* **242**, 55-120.

Khosravi-Far R., Lutz R.J., Cox A.D., Conroy L., Bourne J.R., Sinensky M., Balch W.E., Buss J.E., Der C.J. (1991) Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6264-6268.

Kho Y., Kim S.C., Jiang C., Barma D., Kwon S.W., Cheng J., Jaunbergs J., Weinbaum C., Tamanoi F., Falck J., Zhao Y. (2004) A tagging-via-substrate technology for detection and proteomics of farnesylated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12479-12484.

Kim E., Ambroziak P., Otto J.C., Taylor B., Ashby M., Shannon K., Casey P.J., Young S.G. (1999) Disruption of the mouse *Rce1* gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 8383-8390.

Kinney A.J. (1998) Manipulating flux through plant metabolic pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 173-178.

Kita T., Brown M.S., Goldstein J.L. (1980) Feedback regulation of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase. *J. Clin. Invest.* **66**, 1094-1100.

Klag M.J., Ford D.E., Mead L.A., He J., Whelton P.K., Liang K.Y., Levine D.M. (1993) Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 313-318.

Klein T.M., Fromm M., Weissinger A., Tomes D., Schaaf S., Sletten M., Sanford J.C. (1988a) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4305-4309.

Klein T.M., Harper E.C., Svab Z., Sanford J.C., Fromm M.E., Maliga P. (1988b) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 8502-8505.

Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.

Knöss W., Reuter B., Zapp J. (1997) Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Murrubium vulgare via* a non-mevalonate pathway. *Biochem. J.* **326**, 449-454.

Knox J.J., Siu L.L., Chen E., Dimitroulakos J., Kamel-Reid S., Moore M.J., Chin S., Irish J., Laframboise S., Oza A.M. (2005) A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix. *Eur. J. Cancer* 41, 523-530.

Kodama H. et Komamine A. (1995) Synchronization of cell cultures of higher plants. *Methods in Cell Biol.* 49, 315-329.

Kohl N.E., Omer C.A., Conner M.W., Anthony N.J., Davide J.P., deSolms S.J., Giuliani E.A., Gomez R.P., Graham S.L., Hamilton K. (1995) Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat. Med.* 1, 792-797.

Kost B., Lemichez E., Spielhofer P., Hong Y., Tolias K., Carpenter C., Chua N.H. (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. J. Cell Biol. 145, 317-330.

Kubitscheck U., Homann U., Thiel G. (2000) Osmotically evoked shrinking of guard-cell protoplasts causes vesicular retrieval of plasma membrane into the cytoplasm. *Planta* **210**, 423-431.

Kudla J., Xu Q., Harter K., Gruissem W., Luan S. (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4718-4723.

Kuemmerle H.P., Murakawa T., Sakamoto H., Sato N., Konishi T., De Santis F. (1985b) Fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. Part II: 1. Human pharmacokinetics. 2. Preliminary early phase IIa clinical studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **23**, 521-528.

Kuemmerle H.P., Murakawa T., Soneoka K., Konishi T. (1985a) Fosmidomycin: a new phosphonic acid antibiotic. Part I: Phase I tolerance studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **23**, 515-520.

Kuntz L., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Hemmerlin A., Willem A., Bach T.J., Rohmer M. (2005) Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. Biochem. J. 386, 127-135.

Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S., Seto H. (1998) Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7913-7916.

Kuzuyama T., Takagi M., Takahashi S., Seto H. (2000) Cloning and characterization of 1deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from Streptomyces sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 891-897.

Kyte J. et Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

L

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lange B.M. et Croteau R. (1999) Isoprenoid biosynthesis *via* a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 170-174.

Lange B.M., Rujan T., Martin W., Croteau R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13172-13177.

Lange B.M., Wildung M.R., McCaskill D., Croteau R. (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis *via* a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2100-2104.

Laporte C., Vetter G., Loudes A.-M., Robinson D.G., Hillmer S., Stussi-Garaud C., Ritzenthaler C. (2003) Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of *Grapevine fanleaf virus* movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **15**, 2058-2075.

Laule O., Fürholz A., Chang H.-S., Zhu T., Wang X., Heifetz P.B., Gruissem W., Lange B.M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **11**, 6866-6871.

Lavy M., Bracha-Drori K., Sternberg H., Yalovsky S. (2002) A cell-specific, prenylationindependent mechanism regulates targeting of type II RACs. *Plant Cell* 14, 2431-2450. Lemichez E., Wu Y., Sanchez J.P., Mettouchi A., Mathur J., Chua N.H. (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev.* 15, 1808-1816.

Leonard S., Beck L., Sinensky M. (1990) Inhibition of isoprenoid biosynthesis and the post-translational modification of pro-p21. *J. Biol. Chem.* **265**, 5157-5160.

Leventis R. et Silvius J.R. (1998) Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxyterminal sequence of K-*ras*4B. *Biochemistry* **37**, 7640-7648.

Lewis K.A., Holstein S.A., Hohl R.J. (2005) Lovastatin alters the isoprenoid biosynthetic pathway in acute myelogenous leukemia cells *in vivo*. *Leuk. Res.* **29**, 527-533.

Li H., Lin Y., Heath R.M., Zhu M.X., 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 H., Shen J.J., Zheng Z.L., Lin Y., Yang Z. (2001) The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **126**, 670-684.

Li H., Wu G., Ware D., Davis K.R., Yang Z. (1998) *Arabidopsis* Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol.* **118**, 407-417.

Li L.F., Li G.X., Yang R.B., Guo Z.Y., Liao X.Y. (2004) Clomazone dissipation, adsorption and translocation in four paddy topsoils. *J. Environ. Sci. (China)* 16, 678-682.

Li W.B., Bzik D.J., Gu H.M., Tanaka M., Fox B.A., Inselburg J. (1989) An enlarged largest subunit of *Plasmodium falciparum* RNA polymerase II defines conserved and variable RNA polymerase domains. *Nucleic Acids Res.* 17, 9621-9636.

Li X., Liu L., Tupper J.C., Bannerman D.D., Winn R.K., Sebti S.M., Hamilton A.D., Harlan J.M. (2002) Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 15309-15316.

Li Y., Inoki K., Guan K.L. (2004a) Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7965-7975.

Liao J.K. (2002) Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int. J. Cardiol.* **86**, 5-18.

Lichtenthaler H.K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47-65.

Lichtenthaler H.K. (2000) Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 785-789.

Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A., Rohmer M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds *via* a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**, 271-274.

Lichtenthaler H.K., Zeidler J., Schwender J., Müller C. (2000) The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. <u>Z. Naturforsch.</u> **55**, 305-313.

Lillico S., Field M.C., Blundell P., Coombs G.H., Mottram J.C. (2003) Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 1182-1194.

Lin Y., Wang Y., Zhu J.-K., Yang Z. (1996) Localization of a Rho GTPase implies a role in tip growth and movement of the generative cell in pollen tubes. *Plant Cell* **8**, 293-303.

Lin Y. et Yang Z. (1997) Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth. *Plant Cell* 9, 1647-1659.

Linder M.E., Pang I.H., Duronio R.J., Gordon J.I., Sternweis P.C., Gilman A.G. (1991) Lipid modifications of G protein subunits. Myristoylation of Go alpha increases its affinity for beta gamma. *J. Biol. Chem.* **266**, 4654-4659.

Lindzen E. et Choi J.H. (1995) A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* **28**, 785-797.

Lingham R.B., Silverman K.C., Bills G.F., Cascales C., Sanchez M., Jenkins R.G., Gartner S.E., Martin I., Diez M.T., Pelaez F., Mochales S., Kong Y.-L., Burg R.W., Meinz M.S., Huang L., Nallin-Omstead M., Mosser S.D., Schaber M.D., Omer C.A., Pompliano D.L., Gibbs J.B., Singh S.B. (1993) *Chaetomella acutiseta* produces chaetomellic acids A and B which are reversible inhibitors of farnesyl-protein transferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 370-374.

Liu L., Dudler T., Gelb M.H. (1996) Purification of a protein palmitoyltransferase that acts on H-Ras protein and on a C-terminal N-Ras peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, 23269-23276.

Lloyd A.M., Schena M., Walbot V., Davis R.W. (1994) Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**, 436-439.

Lois L.M., <u>Campos N.</u>, <u>Putra S.R.</u>, <u>Danielsen K.</u>, <u>Rohmer M.</u>, <u>Boronat A</u>. (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme

that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2105-2110.

Lois L.M., Rodriguez-Concepcion M., Gallego F., Campos N., Boronat A. (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-Dxylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* **22**, 503-513.

Long S.B., Casey P.J., Beese L.S. (1998) Cocrystal structure of protein farnesyltransferase complexed with a farnesyl diphosphate substrate. *Biochemistry* **37**, 9612-9618.

Long S.B., Casey P.J., Beese L.S. (2000) The basis for K-Ras4B binding specificity to protein farnesyltransferase revealed by 2 A resolution ternary complex structures. *Structure Fold. Des.* **8**, 209-222.

Long S.B., Casey P.J., Beese L.S. (2002) Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. *Nature* **419**, 645-650.

Long S.B., Hancock P.J., Kral A.M., Hellinga H.W., Beese L.S. (2001) The crystal structure of human protein farnesyltransferase reveals the basis for inhibition by CaaX tetrapeptides and their mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12948-12953.

Loraine A.E., Yalovsky S., Fabry S., Gruissem W. (1996) Tomato Rab1A homologs as molecular tools for studying Rab geranygeranyl transferase in plant cells. *Plant Physiol.* **110**, 1337-1347.

Loreto F., Pinelli P., Brancaleoni E., Ciccioli P. (2004) 13C labeling reveals chloroplastic and extrachloroplastic pools of dimethylallyl pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. *Plant Physiol.* **135**, 1903-1907.

Low M.G. (1989) The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **988**, 427-454.

Low P. et Chandra S. (1994) Endocytosis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 609-631.

Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lowy D.R. et Willumsen B.M. (1993) Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851-891.

Luan S., Kudla J., Rodríguez-Concepción M., Yalovsky S., Gruissem W. (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* Supplement 2002, 389-400. Lützow M., Beyer P., Kleinig H. (1990) The herbicide clomazone does not inhibit the prenyl diphosphate-forming enzymes in plastids. *Z. Naturforsch.* **45c**, 856-858.

Lynch M.A. et <u>Staehelin L.A.</u> (1992) Domain-specific and cell type-specific localization of two types of cell wall matrix polysaccharides in the clover root tip. *J. Cell Biol.* **118**, 467-479.

Μ_____

Ma H. (1998) A serpentine receptor surfaces in Arabidopsis. Tr. Pl. Sci. 3, 248-250.

Ma L., Xu X., Cui S., Sun D. (1999) The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. *Plant Cell* **11**, 1351-1364.

Macara I.G., Lounsbury K.M., Richards S.A., McKiernan C., Bar-Sagi D. (1996) The Ras superfamily of GTPases. *F.A.S.E.B. J.* **10**, 625-630.

Magee T. et Marshall C. (1999) New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* **98**, 9-12.

Malmstrom S., Akerlund H.E., Askerlund P. (2000) Regulatory role of the N terminus of the vacuolar calcium-ATPase in cauliflower. *Plant Physiol.* **122**, 517-526.

Mandel M.A., Feldmann K.A., Herrera-Estrella L., Rocha-Sosa M., Leon P. (1996) CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9, 649-658.

Marcote M., Gu F., Gruenberg J., Aniento F. (2000) Membrane transport in the endocytic pathway: animal versus plant cells. *Protoplasma* **210**, 123-132.

Marshall M.S. (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. <u>F.A.S.E.B. J.</u> 9, 1311-1318.

Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganal M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D., Tanksley S.D. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. <u>Science</u> 262, 1432-1436.

Martin G.B., Frary A., Wu T., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Earle E.D., Tanksley S.D. (1994) A member of the tomato Pto gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. *Plant Cell* **6**, 1543-1552. **Matsumoto K., Asano T., Endo T.** (1997) Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene* **15**, 2409-2417.

Mattoo A.K. et Edelman M. (1987) Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1497-1501.

Matz M.V., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. (2002) Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *BioEssays* 24, 953-959.

Mayer A. (2001) What drives membrane fusion in eukaryotes? *Trends Biochem. Sci.* 26, 717-723.

Mayer M.L., Caplin B.E., Marshall M.S. (1992) CDC43 and RAM2 encode the polypeptide subunits of a yeast type I protein geranylgeranyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267, 20589-20593.

McAinsh M.R., Brownlee C., Hetherington A.M. (1992) Visualizing changes in cytosolic-free Ca²⁺ during the response of stomatal guard cells to abscissic acid. *Plant Cell* **4**, 1113-1122.

McConville M.J. et Menon A.K. (2000) Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). *Mol. Membr. Biol.* **17**, 1-16.

McGarvey D.J. et Croteau R. (1995) Terpenoid metabolism. Plant Cell 7, 1015-1026.

McGuire T.F., Qian Y., Vogt A., Hamilton A.D., Sebti S.M. (1996) Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. *J. Biol. Chem.* **271**, 27402-27407.

McLaughlin S. et Aderem A. (1995) The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 272-276.

McLaughlin R.E. et Denny J.B. (1999) Palmitoylation of GAP-43 by the ER-Golgi intermediate compartment and Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta.* **1451**, 82-92.

McNellis T.W., Mudgett M.B., Li K., Aoyama T., Horvath D., Chua N.H., Staskawicz B.J. (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J.* 14, 247-257.

Melan M.A. (1990) Taxol maintains organized microtubule patterns in protoplasts which lead to the resynthesis of organized cell wall microfibrils. *Protoplasma* **153**, 169-177.

Melkonian K.A., Ostermeyer A.G., Chen J.Z., Roth M.G., Brown D.A. (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. J. Biol. Chem. 274, 3910-3917.

Mérigout P., Képès F., Perret A.-M., Satiat-Jeunemaitre B., Moreau P. (2002) Effects of brefeldine A and nordihydroguaiaretic acid on endomembrane dynamics and lipid synthesis in plant cells. *FEBS Lett.* **518**, 88-92.

Michaelson D., Ahearn I., Bergo M., Young S., Philips M. (2002) Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3294-3302.

Michaelson D., Ali W., Chiu V.K., Bergo M., Silletti J., Wright L., Young S.G., Philips M. (2005) Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Mol. Biol. Cell* 16, 1606-1616.

Michaelson D., Silletti J., Murphy G., D'Eustachio P., Rush M., Philips M.R. (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and rhogdi binding. *J. Cell Biol.* **152**, 111-126.

Miller B., Heuser T., Zimmer W. (1999) A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett.* **460**, 485-490.

Miller B., Heuser T., Zimmer W. (2000) Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5phosphate reductoisomerase gene harboring locus of Synechococcus leopoliensis in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **481**, 221-226.

Mine Y., Kamimura T., Nonoyama S., Nishida M., Goto S., Kuwahara S. (1980) *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of FR-31564, a new phosphonic acid antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)* **33**, 36-43.

Mineyuki Y. (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **187**, 1-49.

Missinou M.A., Borrmann S., Schindler A., Issifou S., Adegnika A.A., Matsiegui P.B., Binder R., Lell B., Wiesner J., Baranek T., Jomaa H., Kremsner P.G. (2002) Fosmidomycin for malaria. *Lancet.* **360**, 1941-1942.

Molendijk A.J., Bischoff F., Rajendrakumar C.S., Friml J., Braun M., Gilroy S., Palme

K. (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J.* **20**, 2779-2788.

Moomaw J.F. et Casey P.J. (1992) Mammalian protein geranylgeranyltransferase. Subunit composition and metal requirements. *J. Biol. Chem.* **267**, 17438-17443.

Moon Y.S. et Kashyap M.L. (2002) Niacin extended-release/lovastatin: combination therapy for lipid disorders. *Expert Opin. Pharmacother.* **3**, 1763-1771.

<u>Moore P.J., Swords K.M., Lynch M.A., Staehelin L.A.</u> (1991) Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J. Cell Biol.* **112**, 589-602.

Moores S.L., Schaber M.D., Mosser S.D., Rands E., O'Hara M.B, Garsky V.M., Marshall M.S., Pompliano D.L., Gibbs J.B. (1991) Sequence dependence of protein isoprenylation. J. Biol. Chem. 266, 14603-14610.

Morehead T.A., Biermann B.J., Crowell D.N., Randall S.K. (1995) Changes in protein isoprenylation during the growth of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **109**, 277-284.

Morejohn L., Bureau T., Molé-Bajer J., Bajer A., Fosket D. (1987) Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. *Planta* **172**, 252-264.

Morise H., Shimomura O., Johnson F.H., Winant J. (1974) Intermolecular energy-transfer in bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**, 2656-2662.

Morita N., Nakazato H., Okuyama H., Kim Y., Thompson Jr. G.A. (1996) Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochem. Biophys. Acta* **1290**, 53-62.

Movafeghi A., Happel N., Pimpl P., Tai G.-H., Robinson D.G. (1999) *Arabidopsis* Sec21p and Sec23p homologs. Probable coat proteins of plant COP-coated vesicles. *Plant Physiol.* **119**, 1437-1445.

Müller C. (2003) Untersuchungen über zwei Enzyme der plastidären Isoprenoidbiosynthese: DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase. *Thèse de Doctorat. Universität Karlsruhe, Fak. f. Chemie und Biowissenschaften, Karlsruhe, Allemagne.*

Mundy G., Garrett R., Harris S., Chan J., Chen D., Rossini G., Boyce B., Zhao M., Gutierrez G. (1999) Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science* 286, 1946-1949.

Murakawa T., Sakamoto H., Fukada S., Konishi T., Nishida M. (1982) Pharmacokinetics of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**, 224-230.

Murashige T. et Skoog F. (1962) A revised medium for growth and rapid bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

N_

Nagamune K., Nozaki T., Maeda Y., Ohishi K., Fukuma T., Hara T., Schwartz R.T., Sutterlin C., Brun R., Riezman H., Kinoshita T. (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 10336-10341.

Nagamune K., Ohishi K., Ashida H., Hong Y., Hino J., Kangawa K., Inoue N., Maeda Y., Kinoshita T. (2003) GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **19**, 10682-10687.

Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the `Hela` cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**,1-30.

Nakagami H., Jensen K.S., Liao J.K. (2003) A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms. *Ann. Med.* **35**, 398-403.

Nakai K. et Horton P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34-36.

Nakai K. et Kanehisa M. (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics.* **14**, 897-911.

Nara Y., Kurata H., Seki M., Taira K. (2000) Glucocorticoid-induced expression of a foreign gene by the GVG system in transformed tobacco BY-2 cells. *Biochem. Eng. J.* 6, 185-191.

Narita J.O. et Gruissem W. (1989) Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* **1**, 181-190.

Nassar N., Horn G., Herrmann C., Scherer A., McCormick F., Wittinghofer A. (1995) The 2.2 A crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**, 554-560.

Nebenführ A. (2002) Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 507-512.

Nebenführ A., Frohlick J.A., Staehelin L.A. (2000) Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiol.* **124**, 135-151.

Nebenführ A., Gallagher L.A., Dunahay T.G., Frohlick J.A., Mazurkiewicz A.M., Meehl J.B., Staehelin L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* **121**, 1127-1141.

Nebenführ A., Ritzenthaler C., Robinson D.G. (2002) Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* **130**, 1102-1108.

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.

Nobes C.D., Lauritzen I., Mattei M.G., Paris S., Hall A., Chardin P. (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J. Cell Biol.* **141**, 187-197.

Nomura K., Kanemura H., Satoh T., Kataoka T. (2004) Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations. *J. Biol. Chem.* **279**, 22664-22673.

Ntwasa M., Egerton M., Gay N.J. (1997) Sequence and expression of *Drosophila* myristoyl-CoA: protein N-myristoyl transferase: evidence for proteolytic processing and membrane localisation. *J. Cell Sci.* **110**, 149-156.

0

Ohizumi H., Masuda Y., Nakajo S., Sakai I., Ohsawa S., Nakaya K. (1995) Geranylgeraniol is a potent inducer of apoptosis in tumor cells. *J. Biochem (Tokyo)* **117**, 11-13.

Ohizumi H., Masuda Y., Yoda M., Hashimoto S., Aiuchi T., Nakajo S., Sakai I., Ohsawa S., Nakaya K. (1997) Induction of apoptosis in various tumor cell lines by geranylgeraniol. *Anticancer Res.* **17**, 1051-1057.

Ohnuma S., Watanabe M., Nishino T. (1996) Identification and characterization of geranylgeraniol kinase and geranylgeranyl phosphate kinase from the *Archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biochem. (Tokyo)* **119**, 541-547.

Okada K., Saito T., Nakagawa T., Kawamukai M., Kamiya Y. (2000) Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 1045-1056.

Okuhara M., Kuroda Y., Goto T., Okamoto M., Terano H., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H. (1980) Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J. Antibiot. (Tokyo)* **33**, 24-28.

Olender E.H. et Simoni R.D. (1992) The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4223-4235.

Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.

Otto J.C., Kim E., Young S.G., Casey P.J. (1999) Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *J. Biol. Chem.* **274**, 8379-8382.

Ownby S.E. et Hohl R.J. (2002) Farnesol and geranylgeraniol: prevention and reversion of lovastatin-induced effects in NIH3T3 cells. *Lipids* **37**, 185-192.

Oxley D. et Bacic A. (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14246-14251.

Ozols J. et Caron J.M. (1997) Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 637-645.

Ρ

Pareyre C., Lasselain M.J., Deysson G. (1979) The mechansim of cytokinesis in plant cells: action of caffeine on the kinetics of a root meristem cell population. *Cytobios.* **26**, 153-166.

Parish C.A., Smrcka A.V., Rando R.R. (1995) Functional significance of beta gammasubunit carboxymethylation for the activation of phospholipase C and phosphoinositide 3kinase. *Biochemistry* **34**, 7722-7727.

Park H.W., Boduluri S.R., Moomaw J.F., Casey P.J., Beese L.S. (1997) Crystal structure

of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. Science 275, 1800-1804.

Park J., Choi H.J., Lee S., Lee T., Yang Z., Lee Y. (2000) Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* **124**, 725-732.

Park J., Gu Y., Lee Y., Yang Z., Lee Y. (2004) Phosphatidic acid induces leaf cell death in *Arabidopsis* by activating the Rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation. *Plant Physiol.* **134**, 129-136.

Park S.B., Howald W.N., Cashman J.R. (1994) S-oxidative cleavage of farnesylcysteine and farnesylcysteine methyl ester by the flavin-containing monooxygenase. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 191-198.

Parmryd I., **Shipton C.A.**, **Andersson B.**, **Dallner G.** (1997) Protein prenylation in spinachtissue specificity and greening-induced changes. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 73-78.

Parmryd I., Shipton C.A., Swiezewska E., Andersson B., Dallner G. (1995) Identification of spinach farnesyl protein transferase. Dithiothreitol as an acceptor *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 234, 723-731.

Patel D.V., Schmidt R.J., Biller S.A., Gordon E.M., Robinson S.S., Manne V. (1995) Farnesyl diphosphate-based inhibitors of Ras farnesyl protein transferase. *J. Med. Chem.* **38**, 2906-2921.

Patterson D.R., inventor.15 septembre 1987. Herbicidal hydroxyamino phosphonic acids and derivatives. Rohm and Haas Corp., U.S. Patent Application No. 4,693,742.

Pei Z.M., Ghassemian M., Kwak C.M., McCourt P., Schroeder J.I. (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* **282**, 287-290.

Peles E., Nativ M., Lustig M., Grumet M., Schilling J., Martinez R., Plowman G.D., Schlessinger J. (1997) Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.* **16**, 978-988.

Perry M., Thomsen G.H., Roeder R.G. (1985) Genomic organization and nucleotide sequence of two distinct histone gene clusters from *Xenopus laevis*. Identification of novel conserved upstream sequence elements. *J. Mol. Biol.* **185**, 479-499.

Peyroche A., Antonny B., Robineau S., Acker J., Cherfils J., Jackson C.L. (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell.* **3**, 275-285. **Pfeffer S.** (1999) Transport-vesicle targeting : tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* **1**, E17-E22.

Phillipson B.A., Pimpl P., Da Silva L.L., Crofts A.J., Taylor J.P., Movafeghi A., Robinson D.G., Denecke J. (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* **13**, 2005-2020.

Piel J., Donath J., Bandemer K., Boland W. (1998) Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2478-2481.

Pimpl P., Movafeghi A., Coughlan S., Denecke J., Hillmer S., Robinson D.G. (2000) *In situ* localization and *in vitro* induction of plant COPI-coated vesicles. *Plant Cell* **12**, 2219-2236.

Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

Procopiou P.A., Bailey E.J., Bamford M.J., Craven A.P., Dymock B.W., Houston J.G., Hutson J.L., Kirk B.E., McCarthy A.D., Sareen M., Scicinski J.J., Sharratt P.J., Snowden M.A., Watson N.S., Williams R.J. (1994) The squalestatins : novel inhibitors of squalene synthase. Enzyme inhibitory activities and *in vivo* evaluation of C1-modified analogues. *J. Med. Chem.* **37**, 3274-3281.

Q

Qian D., Zhou D., Ju R., Cramer C.L., Yang Z. (1996) Protein farnesyltransferase in plants: molecular characterization and involvement in cell cycle control. *Plant Cell* **8**, 2381-2394.

Qi Q., Rajala R.V., Anderson W., Jiang C., Rozwadowski K., Selvaraj G., Sharma R., Datla R. (2000) Molecular cloning, genomic organization, and biochemical characterization of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 275, 9673-9683.

R_

Raices M., Chico J.M., Tellez-Inon M.T., Ulloa R.M. (2001) Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the

onset of tuber development. Plant Mol. Biol. 46, 591-601.

Raiteri M., Arnaboldi L., McGeady P., Gelb M.H., Verri D., Tagliabue C., Quarato P., Ferraboschi P., Santaniello E., Paoletti R., Fumagalli R., Corsini A. (1997) Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 1144-1153.

Raju R.V., Kalra J., Sharma R.K. (1994) Purification and properties of bovine spleen N-myristoyl-CoA protein:N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 12080-12083.

Randall S.K., Marshall M.S., Crowell D.N. (1993) Protein isoprenylation in suspensioncultured tobacco cells. *Plant Cell* **5**, 433-442.

Rando R.R. (1996) Chemical biology of protein isoprenylation/methylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 5-16.

Reddy V.S., Safadi F., Zielinski R.E., Reddy A.S. (1999) Interaction of a kinesin-like protein with calmodulin isoforms from *Arabidopsis. J. Biol. Chem.* **274**, 31727-31733.

Reiss Y., Stradley S.J., Gierasch L.M., Brown M.S., Goldstein J.L. (1991) Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21ras protein farnesyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 732-736.

Reuter K., Sanderbrand S., Jomaa H., Wiesner J., Steinbrecher I., Beck E., Hintz M., Klebe G., Stubbs M.T. (2002) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 5378-5384.

Richard S.B., Bowman M.E., Kwiatkowski W., Kang I., Chow C., Lillo A.M., Cane D.E., Noel J.P. (2001) Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 641-648.

Richard S.B., Ferrer J.L., Bowman M.E., Lillo A.M., Tetzlaff C.N., Cane D.E., Noel J.P. (2002) Structure and mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase. An enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 8667-8672.

Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A. (1992) The small GTPbinding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.

Ridley A.J. et Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.

Rieder C., Jaun B., Arigoni D. (2000) On the early steps of cineol biosynthesis in *Eucalyptus globulus. Helv. Chim. Acta* **83**, 2504-2513.

<u>Rilling H.C.</u>, <u>Bruenger E.</u>, <u>Epstein W.W.</u>, <u>Crain P.F.</u> (1990) Prenylated proteins: the structure of the isoprenoid group. <u>Science</u> 247, 318-320.

Rilling H.C., Bruenger E., Leining L.M., Buss J.E., Epstein W.W. (1993) Differential prenylation of proteins as a function of mevalonate concentration in CHO cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 210-215.

Rioja A., Pizzey A.R., Marson C.M., Thomas N.S. (2000) Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS Lett.* **467**, 291-295.

Ritzenthaler C., Nebenführ A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin L., Robinson D. (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* **14**, 237-261.

Robineau S., Chabre M., Antonny B. (2000) Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9913-9918.

Robinson D.G., Hinz G., Holstein S.E.H. (1998) The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* **38**, 47-76.

Rodríguez-Concepción M. (2004) The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 2391-2400.

Rodríguez-Concepción M., Campos N., Lois L.M., Maldonado C., Hoeffler J.-F., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., Boronat A. (2000a) Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli. FEBS. Lett.* **473**, 328-332.

Rodríguez-Concepción M., Toledo-Ortiz G., Yalovsky S., Caldelari D., Gruissem W. (2000b) Carboxyl-methylation of prenylated calmodulin CaM53 is required for efficient plasma membrane targeting of the protein. *Plant J.* **24**, 775-784.

Rodríguez-Concepción M., Yalovsky S., Zik M., Fromm H., Gruissem W. (1999) The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO J.* **18**, 1996-2007.

Rohmer M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574.

Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.

Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahm H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564-2566.

Romano J.D., Schmidt W.K., Michaelis S. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* prenylcysteine carboxyl methyltransferase Ste14p is in the endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2231-2247.

Roper W. (1977) Effects of caffeine on mitotic index, mitotic aberrations and bimitosis with and without aeration. *Arzneimittelforschung* **27**, 1380-1384.

Roskoski Jr. R. (2003) Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **303**, 1-7.

Rothberg K.G., Ying Y.S., Kolhouse J.F., Kamen B.A., Anderson R.G. (1990) The glycophospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J. Cell Biol.* **110**, 637-649.

Rowell C.A, Kowalczyk J.J., Lewis M.D., Garcia A.M. (1997) Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-Ras *in vivo. J. Biol. Chem.* **272**, 14093-14097.

Rozakis-Adcock M., Fernley R., Wade J., Pawson T., Bowtell D. (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**, 83-85.

S_

Sacchettini J.C et Poulter C.D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788-1789.

Saijo Y., Hata S., Sheen J., Izui K. (1997) cDNA cloning and prokaryotic expression of maize calcium-dependent protein kinases. <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> 1350, 109-114.

Saint-Jore C.M., Evins J., Batoko H., Brandizzi F., Moore I., Hawes C. (2002) Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant J.* **29**, 661-678.

Sala F., Parasi B., Burroni S., Amileni A.R., Padralinoy G., Spadari S. (1980) Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the α -like DNA polymerase of plant cells. *FEBS Lett.* **117**, 93-98.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: *a Laboratory Manual*, ed. 2, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.

Sampath P. et Pollard T.D. (1991) Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry* **30**, 1973-1980.

Samuels A. et Bialputra T. (1990) Endocytosis in elongating root cells. J. Cell Sci. 97, 157-165.

Samuels A.L., Giddings T.H., Staehelin L.A. (1995) Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J. Cell Biol.* **130**, 1345-1357.

Samuels A.L. et Staehelin L.A. (1996) Caffeine inhibits cell plate formation by disrupting membrane reorganization just after the vesicle fusion step. *Protoplasma* **195**, 144-155.

Sanderfoot A.A., Assaad F.F., Raikhel N.V. (2000) The *Arabidopsis* genome. An abundance of soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol.* **124**, 1558-1569.

Sandmann G. et Böger P. (1986) Interference of dimethazone with formation of terpenoid compounds. *Z. Naturforsch.* **41c**, 729-732.

Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D., Allen N. (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Partate Science and Technology* **5**, 27-37.

Sapperstein S, Berkower C, Michaelis S. (1994) Nucleotide sequence of the yeast STE14 gene, which encodes farnesylcysteine carboxyl methyltransferase, and demonstration of its essential role in a-factor export. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1438-1449.

Sasaki T. et Takai Y. (1998) The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 641-645.

Sathyanarayanan P.V., Cremo C.R., Poovaiah B.W. (2000) Plant chimeric

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Role of the neural visinin-like domain in regulating autophosphorylation and calmodulin affinity. *J. Biol. Chem.* **275**, 30417-30422.

Satiat-Jeunemaitre B., Cole L., Bourett T., Howard R., Hawes C. (1996) Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J. Microsc.* **181**, 162-177.

Satiat-Jeunemaitre B. et Hawes C. (1992) Redistribution of a Golgi glycoprotein in plant cells treated with Brefeldin A. *J. Cell Sci.* **103**, 1153-1156.

Satiat-Jeunemaitre B. et Hawes C. (1993) The distribution of secretory products in plant cells is affected by Brefeldin A. *Cell Biol. Int.* **17**, 183-193.

Schachter M. (2005) Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **19**, 117-125.

Schafer W.R., Kim R., Sterne R., Thorner J., Kim S.H., Rine J. (1989) Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans. *Science* **245**, 379-385.

Schaller H., Graussem B., Benvéniste P., Chye M.-L., Tan C.-T., Song Y.-H., Chua N.-H. (1995) Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Müll. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiol.* **109**, 761-770.

Schiff P.B., Fant J., Horwitz S.B. (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 227, 665-667.

Schiff P.B. et Horwitz S.B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1561-1565.

Schmidt R.A., Schneider C.J., Glomset J.A. (1984) Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J. Biol. Chem.* **259**, 10175-10180.

Schmidt W.K., Tam A., Fujimura-Kamada K., Michaelis S. (1998) Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11175-11180.

Schmitt D., Callan K., Gruissem W. (1996) Molecular and biochemical characterization of tomato farnesyl-protein transferase. *Plant Physiol.* **112**, 767-777.

Schmitt F. (2002) Expression au cours du cycle cellulaire, localisation et rôle potentiel des cyclines A de plantes. *Thèse de Doctorat d'Etat. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.*

Schopfer C.R. et Hepler P.K. (1991) Distribution of membranes and the cytoskeleton during cell plate formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. J. Cell Sci. **100**, 717-728.

Schroepfer G.J. et Gore I.Y. (1963) Chromatographic separation of allylic alcohols on silicic acid columns: analysis of the nonsaponifiable lipids of an ascites tumor derived from a benzpyrene-induced sarcoma. *J. Lipid Res.* **4**, 266-269.

Schwartz M. (1994) Terpenbiosynthese in *Ginkgo biloba*: eine überraschende Geschichte. *Thèse de Doctorat, 10951, ETH, Zürich, Suisse.*

Schwartz M. et Arigoni D. (1999) Ginkgolide biosynthesis. In comprehensive natural product chemistry: isoprenoids including steroids and carotenoids. Vol. 2 (Cane D.E., ed.), pp. 367-399, Pergamon Press, New York, NY, Etats-Unis.

Schwender J., Müller C., Zeidler J., Lichtenthaler H.K. (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana. FEBS Lett.* **455**, 140-144.

Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H.K., Rohmer M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus. Biochem. J.* **316**, 73-80.

Schwender J., Zeidler J., Groner R., Müller C., Focke M., Braun S., Lichtenthaler F.W., Lichtenthaler H.K. (1997) Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* **414**, 129-134.

Scrase-Field S.A.M.G. et Knight M.R. (2003) Calcium: just a chemical switch? *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 500-506.

Seabra M.C. (1998) Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. *Cell Signal.* **10**, 167-172.

Seabra M.C., Brown M.S., Slaughter C.A., Sudhof T.C., Goldstein J.L. (1992a) Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product. *Cell* **70**, 1049-1057.

Seabra M.C., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Brown M.S. (1992b) Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J. Biol. Chem.* **267**, 14497-14503.

Seabra M.C., Reiss Y., Casey P., Brown M.S., Goldstein J.L. (1991) Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common α-subunit. *Cell* **65**, 429-434.

Sebti S.M. et <u>Hamilton A.D.</u> (2000) Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies. *Oncogene* **19**, 6584-6593.

Seger R. et Krebs E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. <u>F.A.S.E.B. J.</u> 9, 726-735.

Shark K.B., Smith F.D., Harpending P.R., Rasmussen J.L., Sanford J.C. (1991) Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium. Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 480-485.

Sheen J. (1993) Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J.*, **12**, 3497-3505.

Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D.W. (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* **8**, 777-784.

Shigi Y. (1989) Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin a phosphonic acid-containing antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 131-145.

Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Nagamine J., Usami S., Katayama M., Sakagami Y., Machida Y. (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6684-6688.

Shipton C.A., Parmryd I., Swiezewska E., Andersson B., Dallner G. (1995) Isoprenylation of plant proteins *in vivo*. Isoprenylated proteins are abundant in the mitochondria and nuclei of spinach. J. Biol. Chem. 270, 566-572.

Sinensky M., Beck L.A., Leonard S., Evans R. (1990) Differential inhibitory effects of lovastatin on protein isoprenylation and sterol synthesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 19937-19941.

Sinensky M., Fantle K., Trujillo M., McLain T., Kupfer A., Dalton M. (1994) The processing pathway of prelamin A. J. Cell. Sci. 107, 61-67.

Singh S.B., Jayasuriya H., Silverman K.C., Bonfiglio C.A., Williamson J.M., Lingham R.B. (2000) Efficient syntheses, human and yeast farnesyl-protein transferase inhibitory activities of chaetomellic acids and analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 571-580.

Singh S.B., Zink D.L., Liesch J.M., Goetz M.A., Jenkins R.G., Nallin-Omstead M., Silverman K.C., Bills G.F., Mosley R.T., Gibbs J.B., Albers-Schonberg G., Lingham R.B. (1993) Isolation and structure of chaetomellic acids A and B from *Chaetomella acutiseta*: farnesyl pyrophosphate mimic inhibitors of ras farnesyl-protein transferase. *Tetrahedron* 49, 5917-5926.

Sistrunk M.L., Antosiewicz D.M., Purugganan M.M., Braam J. (1994) Arabidopsis TCH3 encodes a novel Ca²⁺ binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell* **6**, 1553-1565.

Skoczylas E. et Swiezewska E. (1996) Protein farnesyltransferase in plants. *Biochimie* **78**, 139-143.

Sluiman H.J. (1984) A pathway of plasma membrane biogenesis bypassing the Golgi apparatus during cell division in the green alga *Cylindrocapsa geminella*. J. Cell Sci. **72**, 89-100.

Smith L.G. (2002) Plant cytokinesis: motoring to the finish. Curr. Biol. 12, R206-R208.

Snedden W.A. et Fromm H. (1998) Calmodulin, calmodulin-regulated proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci.* **3**, 299-304.

Snedden W.A. et Fromm H. (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol.* **151**, 35-66.

Sprenger G.A., Schorken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A.A., Taylor S.V., Begley T.P., Bringer-Meyer S., Sahm H. (1997) Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12857-12862.

Stachel S.E., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens. *Nature* **318**, 624-629.

Staehelin L.A. et Hepler P.K. (1996) Cytokinesis in higher plants. Cell 84, 821-824.

Stearns T. (1995) Green fluorescent protein. The green revolution. Curr. Biol. 5, 262-264.

Steinbacher S., Kaiser J., Eisenreich W., Huber R., Bacher A., Rohdich F. (2003) Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J. Biol. Chem.* **278**, 18401-18407.

Steinbacher S., Kaiser J., Wungsintaweekul J., Hecht S., Eisenreich W., Gerhardt S., Bacher A., Rohdich F. (2002) Structure of 2C-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids. *J. Mol. Biol.* **316**, 79-88.

Stirtan W.G. et Poulter C.D. (1997) Yeast protein geranylgeranyltransferase type-I: steadystate kinetics and substrate binding. *Biochemistry* **36**, 4552-4557.

Stockli J. et <u>Rohrer J.</u> (2004) The palmitoyltransferase of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor cycles between the plasma membrane and endosomes. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2617-2626.

Stöhr C., Schuler F., Tischner R. (1995) Planta 196, 284-287.

Strickland C.L., Windsor W.T., Syto R., Wang L., Bond R., Wu Z., Schwartz J., Le H.V., Beese L.S., Weber P.C. (1998) Crystal structure of farnesyl protein transferase complexed with a CaaX peptide and farnesyl diphosphate analogue. *Biochemistry* **37**, 16601-16611.

Strynadka N.C.J. et James M.N.G. (1989) Crystal structures of the Helix-Loop-Helix calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 951-999.

Suen K.L. et Choi J.H. (1991) Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a carrot calcium-dependent protein kinase: homology to calcium/calmodulin-dependent protein kinases and to calmodulin. *Plant Mol. Biol.* **17**, 581-590.

Sun D.Y., Tang J., Li H.B. (1995) The presence and biological significance of extracellular calmodulin in cells. *Chin. Sci. Bull.* **40**, 1153-1159.

Svetek J., Yadav M.P., Nothnagel E.A. (1999) Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 14724-14733.

Swanson M.S., Carlson M., Winston F. (1990) SPT6, an essential gene that affects transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a nuclear protein with an extremely acidic amino terminus. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4935-4941.

Swiezewska E., Thelin A., Dallner G., Andersson B., Ernster L. (1993) Occurrence of prenylated proteins in plant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 161-166.

Szymanski D.B., Liao B., Zielinski R.E. (1996) Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis Cam-3* promoter. *Plant Cell* **8**, 1069-1077.

Τ_

Tachibana A., Tanaka T., Taniguchi M., Oi S. (1996) Evidence for farnesol-mediated isoprenoid synthesis regulation in a halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *FEBS Lett.* **379**, 43-46.

Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H., Seto H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9879-9884.

Takaishi K., Sasaki T., Kotani H., Nishioka H., Takai Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1047-1059.

Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81, 153-208.

Takeda J. et Kinoshita T. (1995) GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 20, 367-371.

Takos A.M., Dry I.B., Soole K.L. (1997) Detection of glycosyl-phosphatidylinositolanchored proteins on the surface of *Nicotiana tabacum* protoplasts. *FEBS Lett.* **405**, 1-4.

Takos A.M., Dry I.B., Soole K.L. (2000) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchor addition signals are processed in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* **21**, 43-52.

Tam A., Nouvet F.J., Fujimura-Kamada K., Slunt H., Sisodia S.S., Michaelis S. (1998) Dual roles for Ste24p in yeast a-factor maturation: NH2-terminal proteolysis and COOHterminal CAAX processing. *J. Cell Biol.* **142**, 635-649.

Taylor J.S., Reid T.S., Terry K.L., Casey P.J., Beese L.S. (2003) Structure of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *EMBO J.* 22, 5963-5974.

Taylor L.P. et Hepler P.K. (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 461-491.

Testa C.A. et Brown M.J. (2003) The methylerythritol phosphate pathway and its significance as a novel drug target. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **4**, 248-259.

Thai L., Rush J.S., Maul J.E., Devarenne T., Rodgers D.L., Chappell J., Waechter C.J. (1999) Farnesol is utilized for isoprenoid biosynthesis in plant cells via farnesyl

pyrophosphate formed by successive monophosphorylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13080-13085.

Thelin A., Peterson E., Hutson J.L., McCarthy A.D., Ericsson J., Dallner G. (1994) Effect of squalestatin 1 on the biosynthesis of the mevalonate pathway lipids. *Biochem. Biophys. Acta* 1215, 245-249.

Thiel G. et Battey N. (1998) Exocytosis in plants. Plant Mol. Biol. 38, 111-125.

Thiel G., Kreft M., Zorec R. (1998) Unitary endocytic and exocytic events in *Zea mays* L. coleoptile protoplasts. *Plant J.* **13**, 117-120.

Thissen J.A. et Casey P.J. (1993) Microsomal membranes contain a high affinity binding site for prenylated peptides. *J. Biol. Chem.* **268**, 13780-13783.

Thissen J.A., Gross J.M., Subramanian K., Meyer T., Casey P.J. (1997) Prenylationdependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **272**, 30362-30370.

Thoma N.H., Iakovenko A., Owen D., Scheidig A.S., Waldmann H., Goody R.S., Alexandrov K. (2000) Phosphoisoprenoid binding specificity of geranylgeranyltransferase type II. *Biochemistry* **39**, 12043-12052.

Thoma N.H., **Niculae A.**, **Goody R.S.**, **Alexandrov K.** (2001) Double prenylation by RabGGTase can proceed without dissociation of the mono-prenylated intermediate. *J. Biol. Chem.* **276**, 48631-48636.

Thompson G.A. Jr. et Okuyama H. (2000) Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lipid Res.* **39**, 19-39.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Tiede A., Bastisch I., Schubert J., Orlean P., Schmidt R.E. (1999) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol. Chem.* **380**, 503-523.

Torti M., Ramaschi G., Sinigaglia F., Lapetina E.G., Balduini C. (1993) Association of the low molecular weight GTP-binding protein rap2B with the cytoskeleton during platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7553-7557.

Traas J.A., Doonan J.H., Rawlins D.J., Shaw P.J., Watts J., Lloyd C.W. (1987) An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *J. Cell Biol.* **105**, 387-395.

Tregear J.W., Jouannic S., Schwebel-Dugué N, Kreis M. (1996) An unusual protein kinase displaying characteristics of both the serine/threonine and tyrosine families is encoded by the *Arabidopsis thaliana* gene *ATN1*. *Plant Sci.* **117**, 107-119.

Trueblood C.E., Boyartchuk V.L., Picologlou E.A., Rozema D., Poulter C.D., Rine J. (2000) The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4381-92.

Trueblood C.E., Ohya Y., Rine J. (1993) Genetic evidence for *in vivo* cross-specificity of the CaaX box protein prenyl-transferases farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4260-4275.

Trupp M., Raynoschek C., Belluardo N., Ibanez C.F. (1998) Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Neurosci.* **11**, 47-63.

U

Udenfriend S. et Kodukula K. (1995a) Prediction of w site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Meth. Enzymol.* **250**, 571-582.

Udenfriend S. et Kodukula K. (1995b) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 563-591.

Ueda T. et Nakano A. (2002) Vesicular traffic : an integral part of plant life. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 513-517.

Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H., Nakano A. (2001) Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **20**, 4730-4741.

V

Vain P., McMullen M.D., Finer J.J. (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12, 84-88.

Van Der Luit A.H., Olivari C., Haley A., Knight M.R., Trewavas A.J. (1999) Distinct

calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **121**, 705-714.

Vasudevan A., Qian Y., Vogt A., Blaskovich M.A., Ohkanda J., Sebti S.M., Hamilton A.D. (1999) Potent, highly selective, and non-thiol inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I. *J. Med. Chem.* **42**, 1333-1340.

Vaughan M.A. et Vaughn K.C. (1987) Effects of microfilament disrupters on microfilament distribution and morphology in maize root cells. *Histochemistry* **87**, 129-137.

Verkruyse L.A. et Hofmann S.L. (1996) Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase. *J. Biol. Chem.* **271**, 15831-15836.

Verma D.P.S. (2001) Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 751-784.

Vida T.A. et Emr S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell. Biol.* **128**, 779-792.

Vigano T., Hernandez A., Corsini A., Granata A., Belloni P., Fumagalli R., Paoletti R., Folco G. (1995) Mevalonate pathway and isoprenoids regulate human bronchial myocyte proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* **291**, 201-203.

Vogeli U. et Chappell J. (1991) Inhibition of a plant sesquiterpene cyclase by mevinolin. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 157-162.

Vogt A., Qian Y., McGuire T.F., Hamilton A.D., Sebti S.M. (1996) Protein geranylgeranylation, not farnesylation, is required for the G1 to S phase transition in mouse fibroblasts. *Oncogene* **13**, 1991-1999.

Voice J.K., Klemke R.L., Le A., Jackson J.H. (1999) Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* **274**, 17164-17170.

Von Arnim A.G., Deng X.-W., Stacey M.G. (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**, 35-43.

W

Wang S. et Hazelrigg T. (1994) Implications for bcd mRNA localization from spatial

distribution of exu protein in Drosophila oogenesis. Nature 369, 400-403.

Waters S.B., Holt K.H., Ross S.E., Syu L.J., Guan K.L., Saltiel A.R., Koretzky G.A., Pessin J.E. (1995) Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 20883-20886.

Weerdenburg C., Falconer M., Setterfield G., Seagull R. (1986) Effects of taxol on microtubule arrays in cultured higher plant cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **6**, 469-478.

Wei C., Lutz R., Sinensky M., Macara I.G. (1992) p23rab2, a ras-like GTPase with a -GGGCC C-terminus, is isoprenylated but not detectably carboxymethylated in NIH3T3 cells. *Oncogene* **7**, 467-473.

Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M.A. (2002) Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiol.* **130**, 334-346.

Westfall D., Aboushadi N., Shackelford J.E., Krisans S.K. (1997) Metabolism of farnesol: phosphorylation of farnesol by rat liver microsomal and peroxisomal fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 562-568.

White P.J. et Broadley M.R. (2003) Calcium in plants. Annals of Botany 92, 487-511.

Wick S.M. (1991) Spatial aspects of cytokinesis in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 253-260.

Wiegand R.C., Carr C., Minnerly J.C., Pauley A.M., Carron C.P., Langner C.A., Duronio R.J., Gordon J.I. (1992) The *Candida albicans* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase gene. Isolation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **267**, 8591-8598.

Wiesner J., Borrmann S., Jomaa H. (2003) Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol. Res.* **90 Suppl. 2**, S71-S76.

Wilkinson S.C., Powls R., Goad L.J. (1994) The effects of excess exogenous mevalonic acid on sterol and steryl ester biosynthesis in celery (*Apium graveolens*) cell suspension cultures. *Phytochem.* **37**, 1031-1035.

Williams C.L. (2003) The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell. Signal.* **15**, 1071-1080.

Williams R.S., Johnston S.A., Riedy M., DeVit M.J., McElligott S.G., Sanford J.C. (1991) Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated

microprojectiles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2726-2730.

Winegar D.A., Molina y Vedia L., Lapetina E.G. (1991) Isoprenylation of rap2 proteins in platelets and human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 4381-4386.

Winge P., Brembu T., Bones A.M. (1997) Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 483-495.

Winge P., Brembu T., Kristensen R., Bones A.M. (2000) Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **156**, 1959-1971.

Wu G., Li H., Yang Z. (2000) *Arabidopsis* RopGAPs are a novel family of rho GTPaseactivating proteins that require the Cdc42/Rac-interactive binding motif for rop-specific GTPase stimulation. *Plant Physiol.* **124**, 1625-1636.

X_____

Xiao C., Xin H., Dong A., Sun C., Cao K. (1999) A novel calmodulin-like protein gene in rice which has an unusual prolonged C-terminal sequence carrying a putative prenylation site. *DNA Res.* 6, 179-181.

Xue L., Gollapalli D.R., Maiti P., Jahng W.J., Rando R.R. (2004) A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle. *Cell* **117**, 761-771.

Y_____

Yajima S., Nonaka T., Kuzuyama T., Seto H., Ohsawa K. (2002) Crystal structure of 1deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *J. Biochem. (Tokyo)* **131**, 313-317.

Yalovsky S., Kulukian A., Rodriguez-Concepcion M., Young C.A., Gruissem W. (2000a) Functional requirement of plant farnesyltransferase during development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1267-1278.

Yalovsky S., Lorraine A.E., Gruissem W. (1996) Specific prenylation of tomato Rab proteins by geranylgeranyl type-II transferase requires a conserved cysteine-cysteine motif. *Plant Physiol.* **109**, 1349-1359.

Yalovsky S., Rodríguez-Concepción M., Bracha K., Toledo-Ortiz G., Gruissem W. (2000) Prenylation of the floral transcription factor APETALA1 modulates its function. *Plant Cell* **12**, 1257-1266.

Yalovsky S., Rodríguez-Concepción M., Gruissem W. (1999) Lipid modifications of proteins-slipping in and out of membranes. *Trends Plant Sci.* **4**, 439-445.

Yalovsky S., Trueblood C.E., Callan K.L., Narita J.O., Jenkins S.M., Rine J., Gruissem W. (1997) Plant farnesyltransferase can restore yeast Ras signaling and mating. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1986-1994.

Yamochi W., Tanaka K., Nonaka H., Maeda A., Musha T., Takai Y. (1994) Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol.* **125**, 1077-1093.

Yan J., Roy S., Apolloni A., Lane A., Hancock J.F. (1998) Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 24052-24056.

Yang F., Moss L.G., Phillips Jr. G.N. (1996a) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1246-1251.

Yang T. et Poovaiah B.W. (2000) *Arabidopsis* chloroplast chaperonin 10 is a calmodulinbinding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 601-607.

Yang T. et Poovaiah B.W. (2002) A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 45049-45058.

Yang T. et Poovaiah B.W. (2002b) Hydrogen peroxide homeostasis : activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4097-4102.

Yang T. et Poovaiah B.W. (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* **8**, 505-512.

Yang T., Segal G., Abbo S., Feldman M., Fromm H. (1996) Characterization of the calmodulin gene family in wheat: Structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 684-694.

Yang T.T., Kain S.R., Kitts P., Kondepudi A., Yang M.M., Youvan D.C. (1996) Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red-shifted variant. *Gene* **173**, 19-23.

Yang Z. (2002) Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* **14**, S375-388.

Yang Z., Cramer C.L., Watson J.C. (1993) Protein farnesyltransferase in plants. Molecular cloning and expression of a homolog of the beta subunit from the garden pea. *Plant Physiol.* **101**, 667-674.

Yasuhara H. et Shibaoka H. (2000) Inhibition of cell-plate formation by brefeldin A inhibited the depolymerization of microtubules in the central region of the phragmoplast. *Plant Cell Physiol.* **41**, 300-310.

Yasuhara H., Sonobe S., Shibaoka H. (1993) Effects of taxol on the development of the cell plate and of the phragmoplast in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **34**, 21-29.

Yasuhara H., Sonobe S., Shibaoka H. (1995) Effects of brefeldin A on the formation of the cell plate in tobacco BY-2 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **66**, 274-281.

Ye G.N., Daniell H., Sanford J.C. (1990) Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **15**, 809-819.

Yim B.T. et Chong P.H. (2003) Niacin-ER and lovastatin treatment of hypercholesterolemia and mixed dyslipidemia. *Ann. Pharmacother.* **37**, 106-115.

Yokoyama K. et Gelb M.H. (1993) Purification of a mammalian protein geranylgeranyltransferase. Formation and catalytic properties of an enzyme-geranylgeranyl pyrophosphate complex. *J. Biol. Chem.* **268**, 4055-4060.

Yokoyama K., Goodwin G.W., Ghomashchi F., Glomset J.A., Gelb M.H. (1991) A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5302-5306.

Yokoyama K., McGeady P., Gelb M.H. (1995) Mammalian protein geranylgeranyltransferase-I: substrate specificity, kinetic mechanism, metal requirements, and affinity labeling. *Biochemistry* **34**, 1344-1354.

Yokoyama K., Zimmerman K., Scholten J., Gelb M.H. (1997) Differential prenyl pyrophosphate binding to mammalian protein geranylgeranyltransferase-I and protein farnesyltransferase and its consequence on the specificity of protein prenylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 3944-3952.

Youl J.J., Bacic A., Oxley D. (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana alata* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7921-7926.



Zeidler J.G. et Lichtenthaler H.K. (1998) Two simple methods for measuring isoprene emission of leaves by UV-spectroscopy and GC-MS. *Z. Naturforsch.* **53c**, 1087-1089.

Zeidler J., Schwender J., Müller C., Lichtenthaler H.K. (2000) The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 796-798.

Zeidler J.G., Schwender J., Müller C., Wiesner J. Weidemeyer C., Beck E., Jomaa H., Lichtenthaler H.K. (1998) Inhibition of the non-mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin *Z. Naturforsch.* 53c, 980-986.

Zhang F.L. et Casey P.J. (1996a) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241-269.

Zhang F.L. et Casey P.J. (1996b) Influence of metal ions on substrate binding and catalytic activity of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *Biochem. J.* **320**, 925-932.

Zhang F.L., Kirschmeier P., Carr D., James L., Bond R.W., Wang L., Patton R., Windsor W.T., Syto R., Zhang R., Bishop W.R. (1997a) Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as *in vitro* substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type I. *J. Biol. Chem.* 272, 10232-10239.

Zhang H., **Seabra M.C.**, **Deisenhofer J.** (2000) Crystal structure of Rab geranylgeranyltransferase at 2.0 A resolution. *Structure Fold. Des.* **8**, 241-251.

Zhang L., Tschantz W.R., Casey P.J. (1997b) Isolation and characterization of a prenylcysteine lyase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 23354-23359.

Zheng Z.L., Nafisi M., Tam A., Li H., Crowell D.N., Chary S.N., Schroeder J.I., Shen J., Yang Z. (2002) Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2787-2797.

Zheng Z.L. et Yang Z. (2000) The Rop GTPase switch turns on polar growth in pollen. *Trends Plant Sci.* **5**, 298-303.

Zhong W.B., Wang C.Y., Chang T.C., Lee W.S. (2003) Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells *via* inhibition of protein geranylgeranylation and *de novo* protein synthesis. *Endocrinology* **144**, 3852-3859.

Zhu J.-K., Shi J., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (1993) Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ. *Plant Cell* **5**, 341-349.

Zielinski R.E. (1998) Calmodulin and calmodulin binding proteins in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 697-725.

Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. (2000) The transfert of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* **23**, 11-28.

<u>Coordonnées :</u>

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes Centre National de la Recherche Scientifique Unité Propre de Recherches 2357 Département Métabolisme et Fonction des Isoprénoïdes chez les Végétaux Equipe Biosynthèse et Fonctions des Isoprénoïdes chez les Plantes Institut de Botanique 28, rue Goethe 67083 Strasbourg cedex France

Adresse électronique : <u>Esther.Gerber@ibmp-ulp.u-strasbg.fr</u> Tél. : 03 90 24 18 48 Fax. : 03 90 24 19 21