



**HAL**  
open science

# Les protéines à domaines LIM chez le protoplaste de tournesol (*Helianthus annuus* L.) : expression des gènes et cytolocalisation

Anne-Claire Bordel

## ► To cite this version:

Anne-Claire Bordel. Les protéines à domaines LIM chez le protoplaste de tournesol (*Helianthus annuus* L.) : expression des gènes et cytolocalisation. Biochimie [q-bio.BM]. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2000. Français. NNT : . tel-00012190

**HAL Id: tel-00012190**

**<https://theses.hal.science/tel-00012190>**

Submitted on 28 Apr 2006

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

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

# THESE

présentée à

**l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE de TOULOUSE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

Spécialité :

**BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE VEGETALE**

Par

**Anne-Claire BORDEL**



**LES PROTEINES A DOMAINES LIM CHEZ LE PROTOPLASTE DE TOURNESOL  
(*Helianthus annuus L.*) : EXPRESSION DES GENES ET CYTOLOCALISATION.**



Soutenue le vendredi 22 décembre 2000, devant le jury composé de :

M. H. LE GUYADER	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
M. Y. MEYER	Directeur de recherche, CNRS, Perpignan	Rapporteur
M. G. ALIBERT	Professeur, INP-ENSAT, Toulouse	Examineur
M. C. BRIERE	Chargé de recherche, CNRS, Toulouse	Examineur
M. M. PETITPREZ	Professeur, INP-ENSAT, Toulouse	Examineur
M. A. STEINMETZ	Directeur de recherche, IBMP-CNRS, Strasbourg	Examineur

*INP-ENSAT*

*Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes*

*Pôle de Biotechnologies Végétales - Chemin de Borderouge – 31 326 Castanet Tolosan*

# AVANT PROPOS

Je tiens à remercier ici Monsieur le Professeur G. Alibert, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes pendant la durée de mon DEA et pendant la préparation de ma thèse.

Toute ma reconnaissance va également à M. H. Le Guyader et à M. Y. Meyer, qui ont accepté de juger ce travail. Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

Je remercie vivement A. Steinmetz, directeur de recherche à l'IBMP de Strasbourg, pour la confiance qu'il m'a accordée durant ces deux années de collaborations, ainsi que pour ses excellents conseils.

Enfin, un remerciement particulier à C. Brière, ainsi qu'à M. Petitprez, qui ont fait tout leur possible pour que ma thèse se déroule dans les meilleures conditions, et dont les conseils judicieux m'ont guidés tout au long de la réalisation de ce travail.

## **Un grand merci**

à

Philippe Anson, pour sa gentillesse, sa disponibilité, sans oublier les bons plans montagne...

à

Henri Barthou, pour m'avoir formée efficacement à toutes les techniques de biologie cellulaire, et pour ses conseils de tous les instants.

à

Marie-José Tavella et Cathy Giovannini, pour leur serviabilité inépuisable.

à

Annie Perrault, pour son aide technique et sa patience à extraire inlassablement les ARN des protoplastes.

à

Alain Jauneau, pour son enthousiasme et son aide efficace en microscopie et analyse d'image.

à

toute l'équipe « Helianthus » de l'IBMP de Strasbourg, pour son accueil chaleureux ; merci plus particulièrement à Christophe, sans qui rien n'aurait été possible, et Jean-Luc, pour sa promptitude à venir à mon aide par e-mail.

## **Sans oublier**

Tous les membres du laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, pour m'avoir permis de travailler dans la bonne humeur. Merci en particulier à Dragana Vasic, Valérie Legrand, Bénédicte Alibert, Olivier Lucas, Delphine Hervé, Françoise Fabre et Christine Vidal.

## RESUME

Les protéines LIM constituent une famille de molécules régulatrices possédant dans leur séquence protéique un ou plusieurs motifs en doigts de zinc – les domaines LIM – dont la fonction principale est de diriger les interactions protéine-protéine. Les protéines LIM ont ainsi la capacité d'interagir avec de multiples partenaires protéiques, et participent à l'assemblage et au maintien de certains des complexes macromoléculaires présents au sein de la cellule. La plupart des protéines LIM ont été caractérisées dans les cellules animales, où elles sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, ainsi que dans la régulation de la transcription. A ce jour, seules quelques protéines LIM ont été décrites chez les végétaux. La fonction de ces protéines LIM végétales reste encore à identifier. Afin de préciser le rôle des protéines LIM chez le tournesol, nous avons choisi comme modèle expérimental le protoplaste d'hypocotyle de tournesol, en raison de la possibilité de moduler son développement en fonction des conditions de culture.

Nous avons étudié l'expression des gènes LIM précédemment décrits chez le tournesol dans les protoplastes par RT-PCR. Nous avons détecté un transcrite pour le gène *HaW LIM-1*, mais pas pour les deux autres gènes *HaP LIM-1* et *HaP LIM-2*. Des anticorps polyclonaux spécifiques de la protéine *HaW LIM-1* reconnaissent en immunoblot deux polypeptides distincts, dont les masses moléculaires sont respectivement de 52 kDa et 78 kDa. Ces masses moléculaires sont nettement supérieures à la taille attendue pour la protéine *HaW LIM-1*. Ces résultats indiquent que la protéine n'est pas présente sous forme de monomères dans les protoplastes, mais qu'elle participe à la formation de complexes protéiques stables.

L'étude par immunocytologie de la localisation intracellulaire de la protéine *HaW LIM-1* révèle que cette protéine est présente simultanément dans deux compartiments distincts : le noyau et le cytoplasme. Dans le noyau, elle s'accumule préférentiellement dans le nucléole, et pourrait jouer un rôle dans la régulation de la transcription des gènes des ARNr, ou dans l'assemblage des ribosomes. Dans le cytoplasme, différentes approches, incluant des expériences de double-marquage et de déstructuration de composants du cytosquelette, ont permis de mettre en évidence une très forte colocalisation de la protéine *HaW LIM-1* avec les microtubules, ce qui suggère un rôle pour cette protéine dans l'organisation du cytosquelette.

Lors de la culture des protoplastes, le gène *HaW LIM-1* s'exprime constamment, avec cependant des variations dans le niveau d'expression. Des expériences d'immunoblot utilisant les anticorps spécifiques de la protéine *HaW LIM-1* indiquent que de nouveaux polypeptides, de masses moléculaires égales à 35 kDa, 42 kDa et 64 kDa, apparaissent au cours de la culture. Cette observation suggère que la protéine *HaW LIM-1* possède la capacité de s'associer et de se dissocier avec de nouveaux complexes protéiques au cours du développement. La protéine *HaW LIM-1* est associée aux microtubules pendant tous les stades de la division : elle est présente au niveau de la bande préprophasique à la fin de l'interphase, au niveau du fuseau mitotique pendant la mitose, et au niveau du phragmoplaste pendant la cytokinèse. Ces observations semblent indiquer que la protéine *HaW LIM-1* occupe une fonction importante au niveau des microtubules.

---

### MOTS-CLEFS

*Helianthus annuus* - protoplaste - protéines LIM - cytosquelette - immunodétection - RT-PCR

# ABSTRACT

LIM proteins have been described as developmental regulators of eucaryotic organisms. They are characterized by the presence of one or several double zinc finger motifs, called LIM domains, in their sequence, which function by mediating protein-protein interactions. LIM proteins have the ability to interact with multiple protein partners. The majority of LIM proteins have been characterized in animal cells where they have been localized in the nucleus and in the cytoplasm. Nuclear LIM proteins, owing to their capacity to mediate numerous interactions, play an important role in the regulation of transcription. These proteins are involved in the control of key developmental processes, like cell division and embryonic development. Cytoplasmic LIM proteins are generally associated to actin cytoskeleton, and could regulate cytoskeleton dynamic. Several LIM proteins have been described to date in plants, but the biological functions of these proteins remained to be determined. To study the function of LIM proteins in sunflower, sunflower hypocotyl protoplasts were used as experimental model, as their development can be modulated by varying culture conditions.

Using primer sets specific for each of the previously described LIM genes from sunflower, we have studied their expression in sunflower protoplasts by RT-PCR. We detected a transcript only for the gene *HaWLIM-1*, but not for the other two genes *HaPLIM-1* and *HaPLIM-2*. On immunowestern blots, polyclonal antibodies directed against HaWLIM-1 protein recognized two proteins of 52 and 78 kDa respectively, indicating that the protein is not present as the 21 kDa monomer but rather as stable higher molecular structures. Immunocytolocalization studies showed that HaWLIM-1 is located in the nucleus and in the cortical cytoplasm. In the nucleus, it concentrated mainly in the nucleolus and could therefore play a role in the transcription of rRNA genes or the assembly of ribosomes. In the cytoplasm, different approaches, including double labelling and drug application, showed a strong colocalization of HaWLIM-1 with microtubules, suggesting a role in cytoskeleton organization.

*HaWLIM-1* gene expression decreases during protoplast culture. Immunoblot experiments showed that antibodies directed against HaWLIM-1 recognized new proteins during culture, indicating that HaWLIM-1 protein could interact with other high molecular structures during protoplast development. Moreover, HaWLIM-1 protein showed a strong colocalization with microtubules during all the steps of cell division.

---

## KEYWORDS

*Helianthus annuus* - Protoplast – LIM protein - cytoskeleton – immunodetection – RT-PCR

## ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANA	acide naphthalène acétique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
BAP	6-benzyl aminopurine
BET	bromure d'éthidium
BSA	albumine sérique bovine
CTAB	hexadecyl trimethyl ammonium bromide
2.4 D	acide 2.4 dichlorophénoxyacétique
DAPI	4'-6 diamino 2-phénylindole
DEPC	di-éthyl pyrocarbonate
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DTT	dithiothreitol
EDTA	éthylènediamine tétraacétate
EGTA	éthylène glycol bis (béta amino éthyl ether) N,N,N' tétraacétate
FDA	di-acétate de fluoresceine
FITC	isothiocyanate de fluoresceine
GST	gluthation-S-transférase
IPM	indice de polymérisation des microtubules
IPTG	isopropyl béta D thiogalactoside
MAP	protéines associées aux microtubules
MES	2 – (N-morpholino) éthane sulfonate
MTs	microtubules
NGS	sérum de chèvre normal
NLS	signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PBS	tampon phosphate salin
PFA	paraformaldéhyde
PIPES	acide pipérazine-N, N'-bis-2-éthane sulfonique
PM	poïds moléculaire
PMSF	phényl méthyl sulfonyl fluoride
PVPP	polyvinylpyrrolidone
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TBS	tampon Tris salin
TLD	milieu L4 de Chupeau modifié
Tris	tris (hydroxyméthyl) amino méthane
Tween 80	poly oxyéthylène sorbitan monooléate

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : Les protéines LIM.....</b>	<b>4</b>
<b>I. LES PROTEINES LIM.....</b>	<b>5</b>
A. Le domaine LIM.....	5
B. Les protéines LIM sont impliquées préférentiellement dans les interactions protéine-protéine.....	6
C. Classification des protéines LIM.....	7
C1. Les protéines « LIM-only ».....	7
C2. Les protéines LIM à homéodomaine ou protéines LIM LHX.....	7
C3. Les protéines LIM comportant d'autres domaines protéiques fonctionnels.....	8
<b>II. LES PROTEINES LIM ANIMALES.....</b>	<b>8</b>
A. Les protéines LIM nucléaires : implication dans la régulation de la transcription.....	8
A1. Les protéines LIM nucléaires favorisent la formation des complexes de transcription.....	9
A2. Les protéines LIM nucléaires peuvent inhiber la transcription.....	9
A3. Les protéines LIM nucléaires sont impliquées dans le contrôle du développement.....	10
B. Les protéines LIM cytoplasmiques : association avec le cytosquelette.....	10
B1. Les protéines LIM localisées au niveau des points d'adhésion focaux.....	11
B2. Les protéines LIM associées au cytosquelette d'actine.....	12
C. Les protéines LIM présentant une double localisation intracellulaire nucléaire/cytoplasmique.....	14
C1. Les protéines LIM CRP.....	14
C2. Les protéines sLIM.....	15
C3. Le cas particulier de la zyxine.....	15
<b>III. LES PROTEINES LIM VEGETALES.....</b>	<b>16</b>
A. Les différentes protéines LIM végétales identifiées.....	16
B. Les protéines LIM végétales sont des protéines « LIM-only » structurellement proches des protéines CRP animales.....	16
C. Les particularités des protéines LIM végétales par rapport aux protéines CRP animales.....	17
D. Fonction des protéines LIM végétales ?.....	17

## CHAPITRE 1

### Etude de l'expression des gènes LIM dans les protoplastes de tournesol..... 19

#### I. ETUDE PAR RT-PCR DE L'EXPRESSION DES GENES LIM DANS LES PROTOPLASTES DE TOURNESOL...

20

A. Mise au point d'une méthode d'extraction d'ARN à partir de protoplastes de tournesol.....	20
A1. Les différents protocoles d'extraction d'ARN utilisés sur les protoplastes de tournesol.....	21
A2. Quantification et estimation de la qualité des ARN par spectrophotométrie.....	21
A3. Estimation de la qualité des ARN par électrophorèse.....	22
A4. Contrôle de la présence d'ADN contaminant par PCR.....	23
B. Profil d'expression des gènes <i>HaPLIM-1</i> , <i>HaPLIM-2</i> et <i>HaWLIM-1</i> dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	24

#### II. ETUDE PAR WESTERN BLOT DE LA PROTEINE HaWLIM-1 DANS LES PROTOPLASTES DE TOURNESOL.

26

A. Les anticorps polyclonaux spécifiques de la protéine HaWLIM-1 reconnaissent plusieurs polypeptides dans les protoplastes de tournesol.....	26
B. Le signal observé est spécifique.....	27
C. Implication de la protéine HaWLIM-1 dans des complexes protéiques ?.....	28

#### III. DISCUSSION..... 29

A. Seul le gène <i>HaWLIM-1</i> s'exprime dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	29
B. La protéine <i>HaWLIM-1</i> est présente sous plusieurs formes dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	29
C. Quelles sont les fonctions des différentes formes de la protéine <i>HaWLIM-1</i> dans les cellules végétales ? .....	31

## CHAPITRE 2

### Localisation de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes de tournesol.....32

#### I. LA PROTEINE HaWLIM-1 PRESENTE UNE DOUBLE LOCALISATION DANS LES PROTOPLASTES.....

33

#### II. LES PROTEINES HaWLIM-1 NUCLEAIRES..... 33

A. Les protéines <i>HaWLIM-1</i> nucléaires s'accumulent préférentiellement dans le nucléole.....	33
B. Immunodétection de la protéine <i>HaWLIM-1</i> dans le noyau des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	34

#### III. LES PROTEINES HaWLIM-1 CYTOPLASMIQUES : ASSOCIATION AVEC DES COMPOSANTES DU CYTOSQUELETTE CORTICAL ?..... 35

A. Evaluation de la colocalisation de la protéine <i>HaWLIM-1</i> avec le cytosquelette cortical.....	36
A1. Double marquage <i>HaWLIM-1</i> /microfilaments d'actine.....	36
A2. Double marquage <i>HaWLIM-1</i> /microtubules.....	36
B. Devenir de la protéine <i>HaWLIM-1</i> lorsque l'état du cytosquelette est modifié.....	37
B1. Dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline.....	37
B2. Dépolymérisation des microfilaments d'actine par la latrunculine B.....	39
C. Les anticorps anti- <i>HaWLIM-1</i> interagissent-ils avec les microtubules ?.....	41
C1. Expérience de compétition .....	41

C2. Immunodétection de tubulines purifiées à l'aide des anticorps anti-HaWLM-1 .....	42
--	----

<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>42</b>
A. La protéine HaWLIM-1 présente une double localisation intracellulaire dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	43
B. Quel rôle joue la protéine HaWLIM-1 dans le noyau ? .....	43
C. Quel rôle joue la protéine HaWLIM-1 dans le cytoplasme ? .....	45
D. Conclusion.....	47

### CHAPITRE 3

#### **Etude de la protéine HaWLIM-1 au cours des premières étapes du développement..... 49**

##### **I. LE PROCESSUS DE DIVISION CELLULAIRE CHEZ LES PROTOPLASTES D'HYPOCOTYLES DE TOURNESOL..... 50**

A. La dédifférenciation des protoplastes et la reprise du cycle cellulaire.....	51
B. Quantification du processus de division cellulaire au cours de la culture des protoplastes.....	51

##### **II. EXPRESSION DU GENE *HaWLIM-1* AU COURS DE LA CULTURE DES PROTOPLASTES.....52**

A. Etude de l'expression du gène <i>HaWLIM-1</i> par RT-PCR.....	52
B. La RT-PCR comparative : un outil permettant de quantifier l'expression du gène <i>HaWLIM-1</i> au cours de la culture.....	53
B1. Le choix d'un témoin d'expression constitutive.....	53
B2. La stratégie retenue pour l'amplification.....	53
B3. L'expression du gène <i>HaWLIM-1</i> semble diminuer au cours de la culture des protoplastes.....	54
B4. Comment optimiser la technique de RT-PCR comparative ? .....	54
C. Etude de la protéine HaWLIM-1 par immunoblot.....	55

##### **III. LOCALISATION DE LA PROTEINE *HaWLIM-1* AU COURS DE LA CULTURE DES PROTOPLASTES.....**

56

A. Evolution du cytosquelette au cours de la culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	56
A1. Evolution du cytosquelette après l'isolement des protoplastes : cellules en interphase.....	56
A2. Evolution du cytosquelette au cours du cycle cellulaire.....	57
B. Evolution des interactions entre la protéine HaWLIM-1 et les composantes du cytosquelette au cours de la culture des protoplastes.....	58
B1. Dans les cellules en interphase.....	58
B2. Dans les cellules en division.....	58

##### **IV. DISCUSSION..... 59**

A. Implication de la protéine HaWLIM-1 dans la dédifférenciation et la différenciation cellulaire ? .....	59
B. Implication de la protéine HaWLIM-1 dans la division cellulaire ?.....	61
C. Conclusion.....	62

##### **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 63**

A. Quelle est la fonction de la protéine HaWLIM-1 au niveau des microtubules ? .....	64
B. La protéine HaWLIM-1 est-elle impliquée dans les étapes précoces du développement ? .....	65

C. Quels sont les partenaires protéiques de la protéine HaWLM-1 ? .....	66
D. Conclusion.....	66

<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIEL.....</b>	<b>68</b>
<b>I. MATERIEL VEGETAL.....</b>	<b>68</b>
A. Matériel végétal.....	68
B. Semis des akènes de tournesol.....	68
C. Préparation des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.....	68
D. Culture des protoplastes en milieu liquide.....	69
E. Culture des protoplastes après inclusion dans une maille d'agarose.....	69
F. Conditions de culture des protoplastes.....	70
<b>II. PRODUITS SPECIFIQUES.....</b>	<b>70</b>
A. Anticorps.....	70
B. Autres produits.....	70
<b>METHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES.....</b>	<b>71</b>
<b>I. METHODES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....</b>	<b>71</b>
A. Quantification et estimation de la qualité des acides nucléiques par spectrophotométrie.....	71
B. Electrophorèse des acides nucléiques.....	72
<b>II. EXTRACTION D'ARN A PARTIR DE PROTOPLASTES D'HYPOCOTYLES DE TOURNESOL.....</b>	<b>72</b>
A. Création d'un environnement dépourvu de RNase.....	73
B. Préparation des protoplastes cultivés en milieu liquide pour les extractions d'ARN.....	73
C. Extraction des ARN.....	73
D. Elimination de l'ADN contaminant par un traitement à la DNase.....	75
<b>III. DETERMINATION PAR RT-PCR DE L'EXPRESSION DES GENES LIM DANS LES PROTOPLASTES DE TOURNESOL.....</b>	<b>75</b>
A. Transcription inverse.....	75
B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	75
C. RT-PCR comparative.....	76
<b>IV. SEQUENCAGE DE L'ADN ET ANALYSE DE SEQUENCES.....</b>	<b>76</b>
A. Séquençage.....	76
B. Analyse de séquences.....	77
<b>METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.....</b>	<b>77</b>
<b>I. OBTENTION DE PROTEINES DE PROTOPLASTES.....</b>	<b>77</b>
A. Préparation des protoplastes cultivés en milieu liquide pour les extractions protéiques.....	77
B. Isolement de noyaux de protoplastes pour l'extraction de protéines nucléaires.....	77
C. Extraction de protéines de protoplastes.....	77



<b>II. METHODES GENERALES DE BIOCHIMIE.....</b>	<b>78</b>
A. Dosage de protéines selon la méthode de Bradford.....	78
B. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes.....	78
C. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	78
D. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.....	79
E. Western blot.....	79
F. Calcul des masses moléculaires des protéines détectées en Western blot.....	79
<b>III. PURIFICATION DES ANTICORPS ANTI-HaWLIM-1 PAR AFFINITE.....</b>	<b>80</b>
A. Surexpression de la protéine HaWLIM-1 chez <i>Escherichia coli</i> .....	80
B. Purification de la protéine HaWLIM-1 surexprimée.....	81
C. Purification des anticorps anti-HaWLIM-1.....	81
<b>CYTOLOGIE.....</b>	<b>82</b>
<b>I. TRAITEMENTS APPLIQUES AUX PROTOPLASTES.....</b>	<b>82</b>
A. Dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline.....	82
B. Dépolymérisation des microfilaments d'actine par la latrunculine.....	82
C. Fixation des protoplastes.....	82
D. Détermination de l'indice de polymérisation des microtubules (IPM).....	83
<b>II. MARQUAGES CYTOLOGIQUES.....</b>	<b>84</b>
A. Immunofluorescence indirecte.....	84
B. Détermination de la viabilité des protoplastes par l'utilisation du FDA.....	84
C. Marquage des noyaux de protoplastes au DAPI.....	85
<b>III. MICROSCOPIE.....</b>	<b>85</b>
A. Microscopie conventionnelle.....	85
B. Microscopie confocale.....	85
C. Analyse d'images.....	86
<b>ANNEXES.....</b>	<b>87</b>
Annexe n°1 : séquences des gènes LIM de tournesol.....	88
Annexe n°2 : composition des milieux de culture et des tampons.....	96
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>105</b>

# INTRODUCTION GENERALE

Les protéines LIM constituent une famille de molécules régulatrices possédant dans leur séquence protéique un ou plusieurs motifs en doigts de zinc – les domaines LIM – dont la fonction principale est de diriger les interactions protéine-protéine. Les protéines LIM ont ainsi la capacité d'interagir avec de multiples partenaires protéiques, et participent à l'assemblage et au maintien de certains des complexes macromoléculaires présents au sein de la cellule (pour revue, voir Dawid et al., 1995). La majorité des protéines LIM a été caractérisée chez les animaux. Dans les cellules animales, elles présentent deux localisations intracellulaires différentes : nucléaire ou cytoplasmique. En raison de leur présence au niveau des complexes protéiques régulant la transcription, les protéines LIM nucléaires constituent d'importants régulateurs du développement. Les expériences d'inhibition de gènes de protéines LIM nucléaires animales sont révélatrices d'un rôle central des protéines LIM nucléaires dans le développement embryonnaire. Les protéines LIM cytoplasmiques sont pour la plupart impliquées dans la signalisation cellulaire et dans la régulation de la dynamique du cytosquelette.

Les quelques protéines LIM végétales connues à ce jour ont été principalement caractérisées chez le tournesol, chez le tabac et chez *Arabidopsis thaliana*. La fonction de ces protéines LIM végétales reste encore à identifier. Les domaines LIM des protéines végétales présentent un fort degré de similarité avec les domaines LIM des protéines animales de type CRP. De plus, certaines protéines LIM végétales suivent la même double-localisation nucléaire/cytoplasmique que les protéines LIM CRP animales (Mundel et al., 2000). On peut donc supposer que les protéines LIM végétales occupent des fonctions similaires à celles des protéines LIM CRP animales : une fonction au niveau cytoplasmique, en relation avec le cytosquelette, et une fonction au niveau nucléaire, dans la régulation de gènes impliqués dans les étapes précoces du développement des plantes.

Le tournesol est l'une des plantes chez lesquelles les connaissances sur les protéines LIM sont les plus avancées. A ce jour, trois protéines LIM ont pu être identifiées chez cette plante : les protéines HaPLIM-1 (Baltz et al., 1991) et HaPLIM-2 (Eliasson et al., 2000) exprimées spécifiquement dans le pollen, et la protéine HaWLIM-1 (Mundel et al., 2000) présente dans la plupart des organes de la plante. Ces protéines LIM de tournesol n'ont à ce jour aucune fonction clairement identifiée. Notre objectif consiste ainsi à mieux comprendre le rôle de ces protéines chez le tournesol.

Chez les plantes, les protoplastes constituent un modèle expérimental particulièrement bien adapté à l'étude de mécanismes cellulaires complexes, en raison de leur accessibilité et de leur facilité de manipulation. Ils apportent un certain nombre d'avantages par rapport aux tissus ou aux suspensions cellulaires classiques : ce sont des cellules isolées, et qui peuvent être analysées soit au niveau individuel, soit au niveau de la population entière. Chez certains génotypes de tournesol, les protoplastes d'hypocotyles montrent un développement particulier selon leur mode de culture (Chanabé et al., 1991 ; Petitprez et al., 1995). Lorsqu'ils sont cultivés en milieu liquide, ces protoplastes se divisent symétriquement, et se développent par la suite en microcolonies. Par contre, lorsqu'ils sont inclus dans un milieu agarosé, la majorité des protoplastes se divise de façon asymétrique. Il en résulte deux cellules de taille inégale : la petite cellule apicale est à l'origine d'une structure compacte appelée embryoïde, la grande cellule basale constitue l'homologue du suspenseur, caractéristique de l'embryon zygotique. Cette évolution est similaire à un processus

d'embryogenèse somatique. Les protoplastes d'hypocotyles de tournesol peuvent donc constituer un modèle expérimental intéressant pour l'étude du rôle des protéines LIM dans le fonctionnement cellulaire chez le tournesol.

Le travail présenté dans ce manuscrit consiste à analyser l'expression des gènes LIM et la localisation des protéines LIM dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, afin de progresser dans la connaissance de la fonction de ces protéines dans les cellules végétales. L'étude de l'expression des protéines LIM de tournesol dans les protoplastes est analysée dans le premier chapitre ; les expériences présentées dans le second chapitre ont pour objectif de déterminer et de préciser la localisation intracellulaire des protéines LIM dans les protoplastes ; enfin, le troisième chapitre est consacré à l'étude des protéines LIM au cours de la culture des protoplastes, afin de déterminer si celles-ci peuvent jouer un rôle dans les premières étapes du développement chez les plantes.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**  
**Les Protéines LIM**

## I. LES PROTEINES LIM.

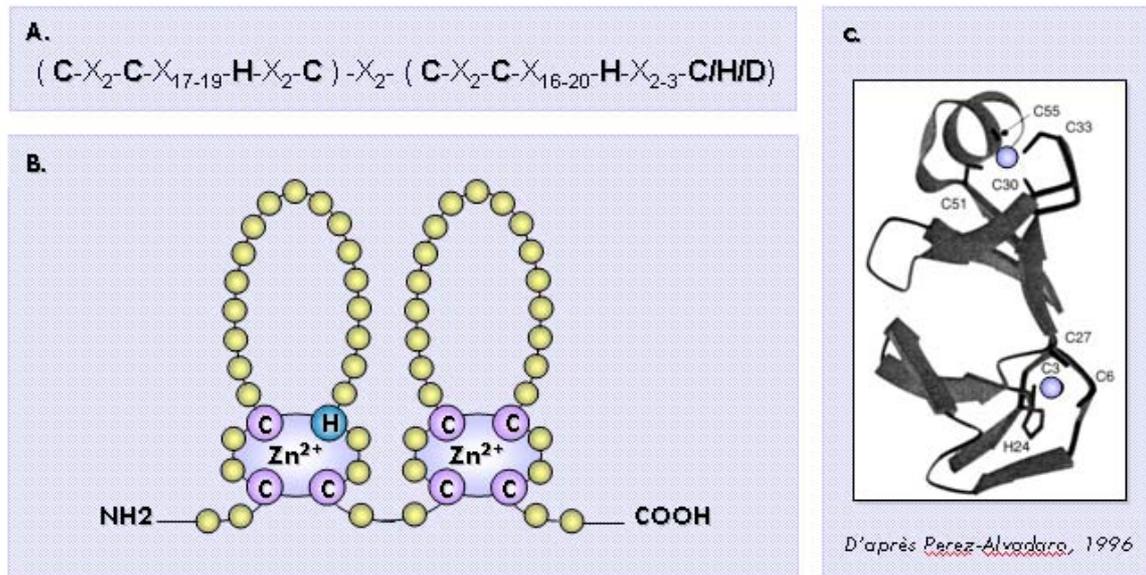
Les protéines LIM constituent une famille de molécules régulatrices impliquées, de façon générale, dans le contrôle du développement. L'acronyme « LIM » dérive des initiales des trois premières protéines LIM identifiées, à savoir *Lin-11* caractérisée chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Freyd et al., 1990), *Isl-1* découverte chez le rat (Karlsson et al., 1990) et *Mec-3* identifiée chez *C. elegans* (Way et Chalfie, 1988). La diversité trouvée parmi les protéines LIM montre qu'elles ne forment pas une famille fonctionnelle, mais plutôt une famille de protéines aux fonctions variées comportant un domaine structural commun : le domaine LIM.

### A. Le domaine LIM

Les domaines LIM sont présents chez de nombreuses protéines issues de tissus et d'organismes très différents : mammifères, amphibiens, oiseaux, insectes, levures et plantes. Cependant, la séquence des domaines LIM de toutes ces protéines est restée très conservée au cours de l'évolution. Il semblerait donc que ces domaines protéiques soient issus d'un gène ancestral commun existant déjà avant la divergence entre les règnes animaux et végétaux, c'est à dire il y a plus d'un million d'années. Cette observation suggère que les domaines LIM sont des domaines protéiques fonctionnellement importants pour la cellule.

Un domaine LIM est constitué de deux unités structurales d'environ 60 acides aminés, riches en histidine et en cystéine (Fig.1). La structure tri-dimensionnelle de ce domaine protéique a pu être déterminée à la suite d'analyse en spectroscopie NMR (Perez-Alvarado et al., 1994 ; Perez-Alvarado et al., 1996 ; Yao et al., 1999). Ces analyses révèlent que chacune des deux unités structurales est organisée autour d'un atome de zinc (Fig. 1B et 1C). La liaison au zinc s'avère essentielle pour stabiliser la structure tertiaire des domaines LIM à l'intérieur de la protéine, et permet de générer une interface pour les interactions moléculaires, de façon similaire aux motifs protéiques « fermeture à leucine » ou « hélice-boucle-hélice ».

Les doigts de zinc constituent une catégorie majeure de motif structural impliqué dans les interactions protéine-ADN. De plus, les domaines LIM présentent des similarités frappantes avec les modules de liaison à l'ADN de certains facteurs de transcription. On peut citer l'exemple des domaines LIM de la protéine LIM CRP-1, qui sont structuralement très proches des domaines de liaison à l'ADN du facteur de transcription GATA-1 (Perez-Alvarado et al., 1994). C'est pourquoi le premier rôle suggéré pour les domaines LIM fut celui de motif de liaison à l'ADN. Cependant, une interaction directe et fonctionnelle des domaines LIM avec les acides nucléiques n'a pour l'instant été démontrée que dans le cas de la protéine LIM végétale NtLIM-1 (Kawaoka et al., 2000).



**Figure 1.** Structure d'un domaine LIM animal.

**A.** Structure primaire : la séquence consensus d'un domaine LIM a été déduite à partir de la comparaison de plusieurs protéines LIM bien caractérisées; les résidus représentés en gras sont impliqués dans la coordination de l'atome de zinc;

**B.** Structure secondaire; **C.** Structure tertiaire : les deux doigts de zinc sont constitués par deux feuillets  $\beta$  antiparallèles; dans le module N-terminal, ces feuillets sont suivis par une boucle qui forme la liaison avec le module suivant; à l'extrémité C-terminale du second module, les feuillets  $\beta$  sont suivis d'une courte hélice  $\alpha$ .

La majorité des observations réalisées jusqu'à présent indique plutôt que la fonction principale des domaines LIM est de permettre les interactions entre protéines. Les études portant sur les interactions s'établissant entre les protéines LIM de type CRP et leurs partenaires protéiques ont permis d'apporter beaucoup de précisions sur le rôle des domaines LIM dans les interactions protéine-protéine. Ainsi, les domaines LIM sont nécessaires et suffisants pour induire l'homodimérisation des protéines CRP (Feuerstein et al., 1994). Un seul domaine LIM peut permettre l'association des protéines LIM CRP avec la zyxine (Schmeichel et Beckerle, 1994). En outre, il existe une spécificité de reconnaissance très forte entre les domaines LIM, puisque l'interaction entre les deux partenaires protéiques précédemment cités implique un domaine LIM particulier de chacune des protéines (Sadler et al., 1992). L'existence de cette spécificité d'interaction amène à penser que chaque domaine LIM pourrait constituer un module d'interaction autonome (Schmeichel et Beckerle, 1994 ; Schmeichel et Beckerle, 1997). Les principales interactions protéine-protéine s'effectuant par l'intermédiaire de domaines LIM et démontrées expérimentalement à ce jour sont reportées dans le tableau (Tab. 1).

Il apparaît donc que les domaines LIM peuvent intervenir à la fois au niveau des interactions protéines-acides nucléiques et des interactions protéine-protéine, de façon similaire aux motifs en doigts de zinc de type GATA (Perez-Alvarado et al., 1994).

## **B. Les protéines LIM sont impliquées préférentiellement dans les interactions protéine-protéine.**

Les interactions protéine-protéine, résultant en des dimérisations ou en des oligomérisations, sont importantes pour de nombreuses fonctions cellulaires. Les domaines protéiques impliqués dans de telles interactions, et retrouvés dans de multiples protéines aux fonctions très variées (tels que les domaines LIM), jouent un rôle central dans l'assemblage des complexes multiprotéiques. On trouve dans la cellule plusieurs domaines protéiques remplissant une fonction d'interface pour les liaisons protéiques : les domaines SH2 et SH3 (Pawson et Gish, 1992 ; Schlessinger et Ullrich, 1992), les répétitions de type ankyrine (Davis et al., 1992 ; Blank et al., 1992) et les motifs « hélice-boucle-hélice » (Lamb et McKnight, 1991 ; Edmondson et Olson, 1993). Les domaines LIM peuvent être associés à cette catégorie de domaines protéiques.

Les protéines LIM possèdent la capacité d'établir des contacts avec leurs partenaires par l'intermédiaire de leur(s) domaine(s) LIM, qui peuvent interagir à la fois avec d'autres domaines LIM et avec des motifs protéiques structurellement très différents, mais également dans certains cas par le biais des autres domaines fonctionnels présents sur la protéine. Les protéines LIM peuvent donc interagir avec des partenaires protéiques de nature très variée.

Plusieurs données importantes permettent d'ébaucher un rôle potentiel pour les protéines LIM : (1) la plupart des protéines LIM possèdent plusieurs domaines LIM (on peut avoir jusqu'à cinq domaines LIM sur une même protéine); (2) un seul domaine LIM est suffisant pour une interaction avec un partenaire protéique (Schmeichel et Beckerle, 1994); (3) les domaines LIM portés par une même protéine sont des modules fonctionnels distincts,

totalément indépendant les uns des autres (Konrat et al., 1998). C'est pourquoi il est désormais admis que les protéines LIM fonctionnent comme des molécules adaptatrices permettant l'assemblage et le maintien de certains des complexes macromoléculaires existant dans la cellule (Kong et al., 1997 ; Rabbitts et al., 1997).

### **C. Classification des protéines LIM.**

Les protéines LIM constituent une famille de protéines très vaste (plus de 100 protéines LIM identifiées à ce jour), complexe et pleine de diversité, et par là même particulièrement difficile à appréhender et à classer. Afin de pouvoir discerner les grandes catégories de protéines LIM, plusieurs considérations peuvent être prises en compte. Taira et Dawid (Taira et al., 1995 ; Dawid et al., 1998) ont choisi de retenir comme critère de classement les homologies de séquences existant entre les domaines LIM présents chez les différentes protéines. Sanchez-Garcia et collaborateurs (Sanchez-Garcia et Rabbitts, 1994) se basent quant à eux sur la nature des domaines protéiques – autres que les domaines LIM – présents chez les protéines LIM. Cette dernière méthode, qui permet de mettre plus particulièrement en avant l'aspect fonctionnel des protéines LIM, sera celle qui sera retenue ici. Les protéines LIM peuvent alors être réparties en trois grands groupes : les protéines «LIM-only», les protéines LIM à homéodomaine et les protéines LIM possédant d'autres domaines protéiques (Fig.2).

#### **C1. Les protéines «LIM-only».**

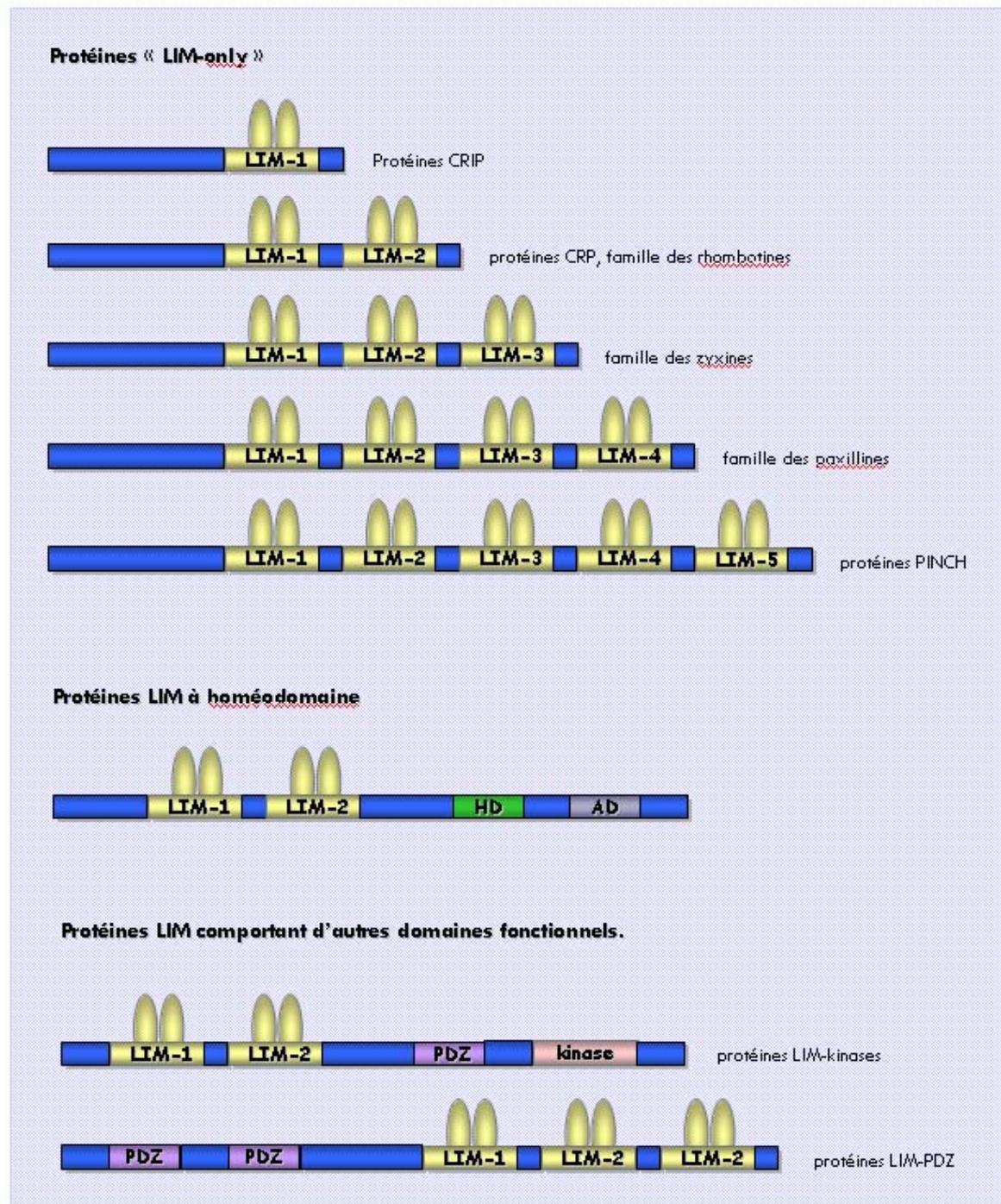
Les domaines LIM constituent l'essentiel de la séquence des protéines «LIM-only». Le nombre de ces domaines LIM peut varier de un à cinq. On observe par exemple la présence de trois domaines LIM chez la zyxine (Crawford et al., 1994), de quatre domaines LIM chez les protéines apparentées à la paxilline (Turner et al., 1994 ; Hagmann et al., 1998), et de cinq domaines LIM chez les protéines LIM PINCH. Chez les protéines «LIM-only», les domaines LIM sont les seuls domaines protéiques identifiables. On considère donc que les protéines «LIM-only» fonctionnent essentiellement en temps que module de liaison, permettant l'assemblage, via leurs multiples domaines LIM, des différents composants de complexes multiprotéiques.

#### **C2. Les protéines LIM à homéodomaine ou protéines LIM LHX.**

Les protéines LIM LHX sont constituées de deux domaines LIM, associés à un homéodomaine et à un domaine d'activation de la transcription. Dans ce cas de figure, les domaines LIM interviennent pour associer à un homéodomaine des régulateurs de sa fonction. Les domaines LIM ayant été découverts via des études sur les protéines à homéodomaine, les protéines LIM LHX constituent à ce jour, et de loin, le groupe de protéines LIM le plus important et le plus étudié. On y trouve en particulier les trois premières protéines LIM caractérisées, à savoir Lin-11 (Freyd et al., 1990), Isl-1 (Karlsson et al., 1990) et Mec-3 (Way et Chalfie, 1988).

<b>Protéine LIM</b>	<b>Partenaire</b>	<b>Référence</b>
<b>Protéines "LIM-only"</b>		
LMO-1	TAL-1 et LYL-1	<i>Wadman &amp; al., 1994</i>
LMO-2	GATA-1, GATA-2 RBP NLI	<i>Osada &amp; al., 1995</i> <i>Mao &amp; al., 1997</i> <i>Wadmann &amp; al., 1997</i>
CRP-1	CRP-1 (homodimère)	<i>Feverstein &amp; al., 1994</i>
CRP-3/MLP	CRP-3/MLP (homodimère) LMO-1 Apterous Myo D $\beta$ spectrine	<i>Arber &amp; al., 1996</i> <i>Kong &amp; al., 1997</i> <i>Flick &amp; al., 2000</i>
CRP-1, CRP-2 et CRP-3/MLP	$\alpha$ actinine zyxine	<i>Louis &amp; al., 1997; Pomies &amp; al., 1997</i> <i>Louis &amp; al., 1997</i>
PINCH	Nck-2 ILK	<i>Tu &amp; al., 1998 et 1999</i> <i>Tu &amp; al., 1999</i>
zyxine	CRP-1, CRP-2, CRP-3 NOC-2	<i>Schmeichel &amp; al., 1994; Louis &amp; al., 1997</i> <i>Kotake &amp; al., 1997</i>
paxilline	protéine phosphatase PEST intégrines $\alpha$ -4	<i>Shen &amp; al., 2000</i> <i>Liu &amp; al., 1999</i>
<b>Protéines LIM à homéodomaine.</b>		
PUM/LHX-3/LIM-3	PIT-1	<i>Bach &amp; al., 1995</i>
LMX-1	E-47/PAN-1	<i>Johnson &amp; al., 1997</i>
<b>Protéines LIM comportant d'autres types de domaines fonctionnels.</b>		
LIMK-1	LIMK-1 (homodimère) LIMK-2 PKC	<i>Kuroda &amp; al., 1996</i> <i>Hiraoka &amp; al., 1996</i>
Enigma	récepteur à l'insuline tyrosine kinase Ret PKC- $\alpha$	<i>Wu &amp; al., 1994</i> <i>Wu &amp; al., 1996</i> <i>Kuroda &amp; al., 1996</i>
ENH	PKC	<i>Kuroda, 1996</i>
ZASP/Cypher1	PKC	<i>Zhou, 1999</i>

**Tableau 1.** Exemples d'interactions protéine-protéine s'effectuant par l'intermédiaire de domaines LIM



**Figure 2.** Représentation schématique de la structure des protéines LIM animales.  
 (LIM : domaine LIM; HD : homéodomaine; AD : domaine d'activation de la transcription; PDZ : domaine PDZ).

### **C3. Les protéines LIM comportant d'autres domaines protéiques fonctionnels.**

Ces protéines forment un groupe structuralement et fonctionnellement hétérogène. Les domaines LIM portés par ces protéines peuvent en effet être associés à des domaines fonctionnels très divers. Les protéines LIM PDZ par exemple comportent un ou plusieurs domaines LIM à leur extrémité C-terminale, associés à plusieurs domaines PDZ localisés au niveau de l'extrémité N-terminale. Les domaines PDZ représentent une catégorie de domaines protéiques qui, comme les domaines LIM, sont impliqués dans l'assemblage et le maintien de complexes multiprotéiques. Parmi les protéines LIM PDZ, on peut citer les protéines Enigma (Wu et Gill, 1994), ENH (Kuroda et al., 1996) et ZASP/Cypher1 (Faulkner et al., 1999), qui possèdent 3 domaines LIM, ainsi que les protéines ALP (Xia et al., 1997), RIL (Kiess et al., 1995) et CLP-36 (Fung et al., 1995), qui possèdent un seul domaine LIM. Les protéines LIM kinases constituent une famille protéique qui peut être rapprochée des protéines LIM PDZ. Elles possèdent en effet deux domaines LIM à leur extrémité N-terminale, un domaine PDZ central, et un domaine kinase à leur extrémité C-terminale. Deux membres de la famille des protéines LIM kinases sont désormais bien caractérisés : il s'agit de la protéine LIMK-1 (Mizuno et al., 1994) et de la protéine LIMK-2 (Nunoue et al., 1995). Les domaines LIM portés par ces différentes protéines pourraient permettre la localisation de la fonction portée par ces domaines fonctionnels dans un compartiment cellulaire précis, le recrutement d'une protéine substrat, ou l'association à ces domaines fonctionnels des régulateurs de leur fonction.

## **II. LES PROTEINES LIM ANIMALES.**

La majorité des protéines LIM identifiées jusqu'à présent sont d'origine animale. C'est donc à partir des études réalisées chez les animaux que l'on a pu ébaucher les fonctions pouvant être assurées par les protéines LIM au sein de la cellule.

Dans les cellules animales, les protéines LIM peuvent présenter deux localisations intracellulaires distinctes : selon leur nature, elles peuvent en effet s'accumuler soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme. Certaines protéines LIM ont également la propriété de pouvoir transiter du noyau au cytoplasme, ou sont présentes simultanément dans les deux compartiments. Bien que les protéines LIM soient systématiquement impliquées dans la formation de complexes macromoléculaires, le fait qu'elles s'accumulent dans des compartiments différents suggère un rôle spécifique pour ces protéines selon leur localisation.

### **A. Les protéines LIM nucléaires : implication dans la régulation de la transcription.**

La transcription et sa régulation requièrent l'assemblage d'un certain nombre de protéines au niveau de l'ADN, et font intervenir des interactions de type protéine-ADN et protéine-

protéine. Les protéines LIM, avec leur aptitude à diriger des interactions moléculaires variées, jouent un rôle important dans ces processus cellulaires.

### **A1. Les protéines LIM nucléaires favorisent la formation des complexes de transcription.**

Les protéines LIM localisées dans le noyau des cellules animales sont principalement des protéines LIM LHX, en raison de la présence d'un homéodomaine dans leur séquence. On peut également trouver certaines protéines «LIM-only». Ces deux catégories de protéines, très différentes au niveau structural, remplissent bien évidemment des fonctions distinctes dans la régulation de la transcription.

Les protéines LIM possédant la capacité de s'associer directement à l'ADN sont considérées comme des facteurs de transcription en tant que tel. C'est le cas des protéines LIM LHX, qui, grâce à leur homéodomaine, peuvent se fixer sur des régions promotrices spécifiques. Les domaines LIM portés par ces protéines permettent alors le recrutement de certaines molécules régulatrices au niveau de l'ADN. Ainsi, les domaines LIM de la protéine Lmx-1, une protéine LIM associée au promoteur à insuline, interagissent avec une protéine basique possédant un motif de type « hélice-boucle-hélice ». Cette simple association conduit à la formation d'un mini-enhancer, nécessaire pour l'expression cellule-spécifique du gène à insuline (German et al., 1992).

Les protéines LIM ne possédant pas d'homéodomains, ou ne possédant pas la capacité de se lier à l'ADN via leurs domaines LIM (ce qui est le cas de la majorité des protéines LIM identifiées à ce jour), n'interviennent que pour diriger l'assemblage et le maintien des complexes de régulation de la transcription. Elles permettent de cette façon la stabilisation de la machinerie transcriptionnelle dans une configuration qui la rend plus accessible pour l'ARN polymérase, ou pour des facteurs de régulation. C'est le cas par exemple de la protéine LMO-2, qui est indispensable à la formation du complexe de liaison à l'ADN de l'érythroïde (Wadmann et al., 1997).

La découverte et la caractérisation de la protéine NLI (Nuclear LIM Interactor) ont permis de mieux comprendre l'intervention des protéines LIM dans la formation des complexes protéiques impliqués dans la régulation de la transcription. Cette protéine nucléaire particulière possède à son extrémité C-terminale un domaine capable d'interagir spécifiquement avec les domaines LIM portés par certaines protéines LIM nucléaires (Visvader et al., 1997 ; Agulnick et al., 1996 ; Jurata et al., 1996). A son extrémité N-terminale est situé un domaine de dimérisation. Les protéines de type NLI pourraient avoir un rôle de pontage, via leur domaine de dimérisation, entre des protéines LIM différentes, dans l'objectif de former des complexes de transcription fonctionnels. Wadmann et collaborateurs (Wadmann et al., 1997) ont pu ainsi isoler un complexe protéique nucléaire, comportant à la fois la protéine NLI et la protéine LIM LMO-2, ainsi que les facteurs de transcription Tal-1, Gata-1 et E2A. L'assemblage et le maintien de ce complexe macromoléculaire sont dépendant des interactions s'établissant entre la protéine NLI et la protéine LIM.

## **A2. Les protéines LIM nucléaires peuvent inhiber la transcription.**

Les protéines LIM nucléaires peuvent intervenir en tant que médiateur pour l'assemblage des complexes de transcription, mais leur rôle peut également être d'empêcher la formation de ces complexes, ce qui induit une inhibition de la transcription.

Le premier modèle d'inhibition a été proposé par Rabbitts et collaborateurs (*Rabbitts et al., 1990*), qui ont montré que certaines protéines «LIM-only» nucléaires pouvaient entrer en compétition avec des protéines LIM à homéodomaine. Ces protéines «LIM-only» se fixent en effet, par l'intermédiaire de leurs domaines LIM, aux domaines LIM portés par les protéines LIM LHX, empêchant ainsi leur dimérisation, processus essentiel pour la fixation de ces facteurs de régulation à l'ADN (Fig.3A).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'activité de liaison spécifique à l'ADN de l'homéodomaine des protéines LIM LHX peut être réprimée par les domaines LIM portés par la protéine. C'est le cas par exemple de la protéine Isl-1 (*Sanchez-Garcia et al., 1993 ; Xue et al., 1993*). Cette capacité du domaine LIM à inhiber l'activité de liaison à l'ADN de l'homéodomaine suggère l'existence d'un mécanisme de « down régulation » de l'activité des protéines LIM LHX (Fig. 3B).

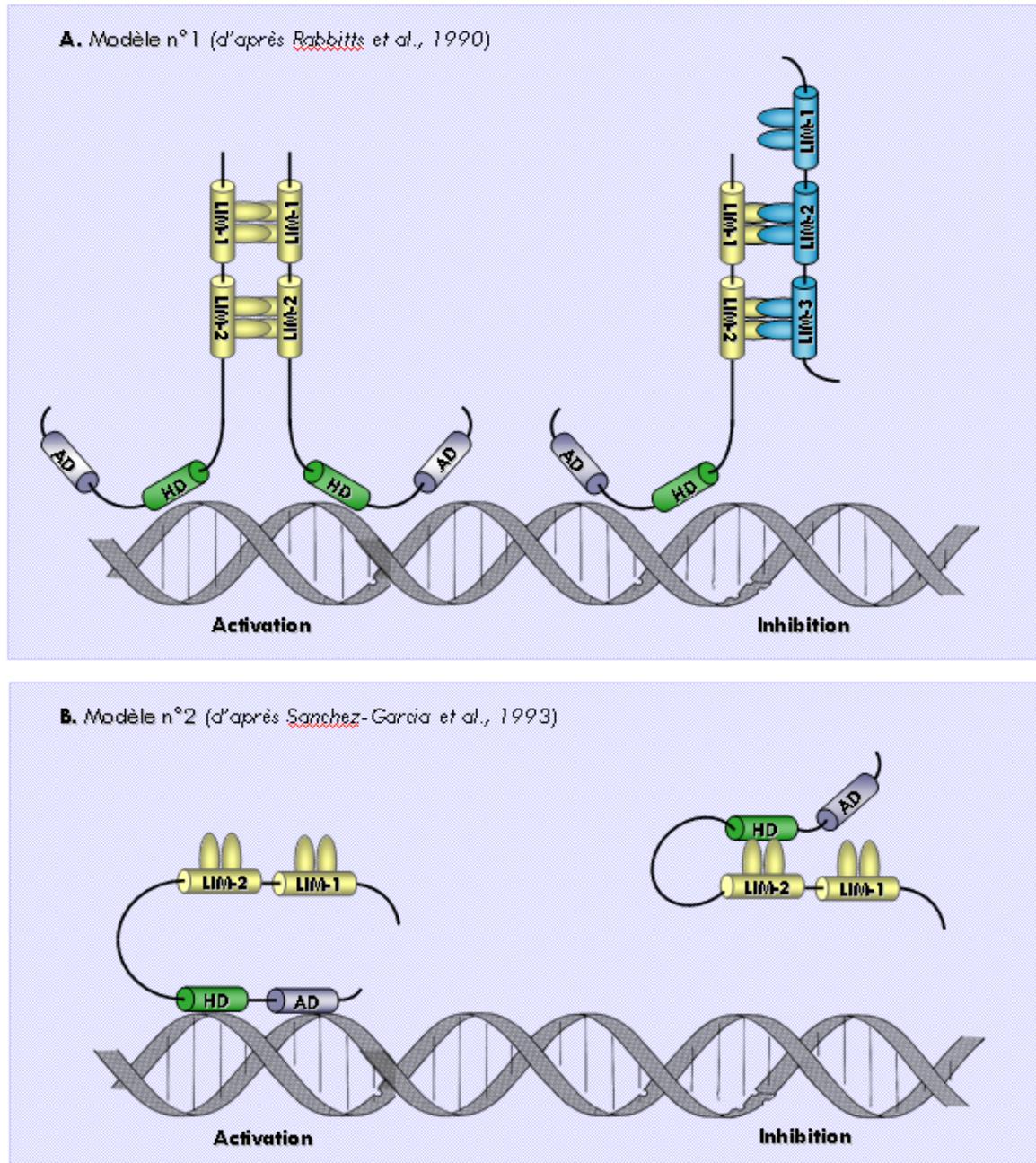
Ces différents modes de régulation dirigés par des protéines LIM constituent une des méthodes mises en œuvre par la cellule pour inhiber l'expression de gènes en réponse à des signaux environnementaux ou à des signaux du développement.

## **A3. Les protéines LIM nucléaires sont impliquées dans le contrôle du développement.**

En raison de leur présence au niveau des complexes protéiques régulant la transcription, les protéines LIM nucléaires peuvent constituer d'importants régulateurs du développement. Des études génétiques, mettant en œuvre des approches d'inhibition et de surexpression des gènes codant pour les protéines LIM nucléaires, ont permis d'apporter des informations sur leur fonction au niveau physiologique. Ces études révèlent que les protéines LIM nucléaires sont principalement impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que dans le contrôle de l'embryogenèse (Tab. 2). Dans certains cas, l'inhibition de gènes codant pour des protéines LIM nucléaires conduit à l'apparition d'anomalies très graves lors de la formation de certains tissus ou organes (*Bourgoin et al., 1992 ; Cohen et al., 1992 ; Shawlot and Behringer, 1995*). Ces diverses observations sont révélatrices d'un rôle central des protéines LIM nucléaires dans les toutes premières étapes du développement.

## **B. Les protéines LIM cytoplasmiques : association avec le cytosquelette.**

Contrairement aux protéines LIM nucléaires, on attribue aux protéines LIM cytoplasmiques un rôle essentiellement structural. Elles sont pour la plupart associées au cytosquelette, et sont impliquées dans les processus d'adhésion et de transduction de signaux.



**Figure 3.** Représentation schématique des mécanismes d'inhibition de la transcription par les protéines LIM (LIM : domaine LIM; HD : homéodomaine; AD : domaine d'activation de la transcription).

Protéine LIM	Espèce	Fonction	Références
<b>Protéines "LIM-only"</b>			
LMO-2	souris	erythropoïèse	Warren & al., 1994
CRP-3/MLP	souris	différenciation des cellules musculaires	Arber & al., 1997
rhomboté-2	souris	développement du système sanguin	Warren & al., 1994
<b>Protéines LIM à homéodomaine</b>			
Mec-3	C. elegans	différenciation des neurones des récepteurs sensoriels	Way & al., 1988
Lin-11	C. elegans	lineage des cellules de la vulve Contrôle de la division asymétrique lors du développement de la vulve	Freyd & al., 1990 Hobert & al., 1998
Tlx-3	C. elegans	différenciation des neurones contrôlant la thermorégulation	Hobert & al., 1997
Apterous	drosophile	formation des muscles	Lundgren & al., 1995
LHX-1	souris	formation du cerveau	Shawlot & al., 1995
LHX-2	souris	formation du cortex cérébral	Porter & al., 1997
LHX-3	souris	formation des lobes antérieurs et intermédiaires	Sheng & al., 1996
let	drosophile	établissement de l'axe de développement production de neurotransmetteurs dans les neurones moteurs	Thor & al., 1997
Isl-1	souris	différenciation des neurones moteurs lors du développement du cerveau	Ptiff & al., 1996
XLIM-1	xénope	établissement de l'axe du corps lors de la gastrulation	Taira & al., 1992
HrLIM	ascidie	détermination du linéage cellulaire de l'endo derme durant la gastrulation	Wada, 1995

**Tableau 2.** Génétique de la fonction des gènes codant pour les protéines LIM nucléaires.

## **B1. Les protéines LIM localisées au niveau des points d'adhésion focaux.**

Les plaques d'adhésion, également appelées points d'adhésion focaux, constituent un exemple de complexe multiprotéique où les protéines LIM sont impliquées. Ces structures permettent le contrôle des contacts s'établissant entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, et pour cette raison jouent un rôle essentiel dans le maintien de la forme des cellules, et dans la transduction de signaux extracellulaires.

De nombreux composants des points d'adhésion focaux sont déjà bien identifiés. Les intégrines, parce qu'elles assurent la liaison avec la matrice extracellulaire, constituent les protéines clés de ces complexes protéiques. A ces intégrines sont associées une grande variété de protéines, parmi lesquelles on peut citer la vinculine, l' $\alpha$ -actinine, la taline, la protéine VASP, la protéine kinase C, la focal adhesion kinase (pp125 FAK), ainsi que les membres de la famille des kinases Src. Plusieurs protéines LIM sont également présentes à différents niveaux des points d'adhésion focaux.

Certaines de ces protéines LIM possèdent la capacité de s'associer directement avec les intégrines. Il s'agit des protéines de la famille des paxillines, qui se lient de façon très spécifique à la région cytoplasmique des intégrines (*Liu et al., 1999*). Les protéines LIM présentes au niveau de ces contacts focaux ont également la propriété d'interagir étroitement avec des protéines liées aux microfilaments d'actine. On peut citer l'exemple de la zyxine, qui se fixe, par l'intermédiaire de son domaine N-terminal riche en proline, sur l' $\alpha$ -actinine (*Sadler et al., 1992 ; Crawford et al., 1994 ; Schmeichel et Beckerle, 1994*). De même, la paxilline peut s'associer à la vinculine (*Koukouritaki et al., 1999*) et la protéine Hic-5 à la taline (*Hagmann et al., 1998*).

Les spéculations abondent sur le rôle potentiel des protéines LIM au niveau des points d'adhésion focaux.

Tout d'abord, la capacité des protéines LIM à interagir avec un grand nombre des protéines présentes au niveau des contacts focaux permet de penser qu'elles stabilisent les complexes protéiques présents à ce niveau grâce à la formation de multiples liaisons croisées. Il a été démontré que la zyxine pouvait effectivement induire une telle stabilisation (*Nix et Beckerle, 1997*).

D'autre part, la zyxine, qui s'accumule de façon importante au niveau des extrémités des microfilaments d'actine (*Crawford et al., 1994*), présente des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes avec une protéine de nucléation de l'actine issue de la bactérie *Listeria monocytogenes* (*Golsteyn et al., 1997*). Il a donc été suggéré que la zyxine pourrait agir comme une protéine de nucléation pour l'actine.

L'adhésion cellulaire est contrôlée par l'intermédiaire de multiples mécanismes. D'une part, l'association des intégrines avec des molécules extracellulaires initie une cascade d'évènements, incluant des processus de phosphorylation. D'autre part, des signaux intracellulaires du même type peuvent également réguler l'adhésion. Les évènements de phosphorylations impliquant des constituants des points d'adhésion focaux peuvent donc intervenir dans ces mécanismes. Les protéines LIM, qui, pour certaines d'entre elles, établissent des relations étroites avec des kinases, peuvent jouer un rôle dans ces mécanismes de régulation.

La paxilline est une protéine LIM centrale au niveau des points d'adhésion focaux car elle établit de multiples contacts avec les protéines kinases. Par exemple, le domaine N-terminal des protéines LIM appartenant à la famille des paxillines présente de nombreux résidus tyrosine, qui sont des sites potentiels de phosphorylation. Ainsi, il a été observé que la paxilline et la protéine Hic-5 pouvaient s'associer à la protéine kinase pp125 FAK via ce type de résidu (Brown *et al.*, 1996 ; Hagmann *et al.*, 1998). De plus, la protéine phosphatase PEST est la première protéine identifiée comme pouvant interagir avec les domaines LIM de la paxilline (Shen *et al.*, 2000). La paxilline peut également être phosphorylée par la protéine kinase ERK (Ku *et Meier*, 2000).

Les protéines LIM de type PINCH constituent également un exemple pertinent de protéines LIM impliquées dans des processus de phosphorylation. Ces protéines se lient de façon très spécifique, par l'intermédiaire de leur premier domaine LIM, à la protéine kinase ILK (Integrin Linked Protein), une protéine kinase à sérine/thréonine liée aux domaines cytoplasmiques des intégrines (Tu *et al.*, 1999). Il a également été démontré que les protéines LIM PINCH interagissent, par l'intermédiaire de leur cinquième domaine LIM, avec la protéine Nck-2, liée physiquement avec des composants de la voie de transduction des signaux des facteurs de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) et PDGF (Platelet - Derived Growth Factor) (Tu *et al.*, 1998). On peut ainsi suggérer que les protéines LIM PINCH fonctionnent en temps qu'adaptateur pour réguler les connexions s'établissant entre les intégrines, via la protéine kinase ILK, et les autres composants de la voie de signalisation du signal facteur de croissance.

## **B2. Les protéines LIM associées au cytosquelette d'actine.**

L'actine agit à la fois comme un capteur et un transducteur de signaux. Le cytosquelette d'actine est dynamique, et le taux de polymérisation/dépolymérisation des microfilaments est un déterminant important pour de nombreux aspects de la physiologie de la cellule : morphologie, transduction de signaux, mobilité cellulaire, division cellulaire ... La dynamique de l'actine est modifiée en réponse à des stimuli externes, qui peuvent être par exemple des hormones, des facteurs de croissance ou des ions. Les mécanismes permettant une dynamique équilibrée du cytosquelette peuvent inclure l'activation de protéines qui régulent la polymérisation de l'actine, ou de protéines-kinases / phosphatases.

Nous avons vu précédemment que certaines protéines LIM localisées au niveau des points d'adhésion focaux possèdent la capacité de s'associer aux microfilaments d'actine. Cette association n'est pas limitée aux contacts focaux, mais peut également être observée sur l'ensemble du réseau d'actine.

En effet, il a récemment été observé, par des approches d'immunocytolocalisation, qu'un certain nombre de protéines LIM cytoplasmiques sont co-localisées avec les microfilaments d'actine. C'est le cas notamment de la protéine LIM-PDZ CLP-36 dans les cellules épithéliales d'embryons de souris (Vallenius *et al.*, 2000), de la protéine LIMK-1 dans des cellules COS en culture (Edwards *et Gill*, 1999b), et également de la zyxine, qui, bien qu'elle s'accumule principalement au niveau des points d'adhésion focaux, est également présente à un moindre degré au niveau des microfilaments d'actine (Reinhard *et al.*, 1999). Des études plus détaillées révèlent que ces protéines ne sont pas seulement colocalisées avec le cytosquelette d'actine, mais qu'elles sont réellement associées aux microfilaments. La limatine, ou abLIM (actin binding LIM protein), est un exemple unique de protéine LIM

s'associant directement aux microfilaments d'actine. La liaison s'effectue par l'intermédiaire d'un domaine non LIM, présentant de fortes homologues avec le domaine de liaison à l'actine de la dématine, une protéine structurale de l'actine présente au niveau de l'érythroïde (Roof *et al.*, 1997). Les autres protéines LIM localisées sur les microfilaments d'actine n'interagissent pas directement avec ceux-ci, mais par l'intermédiaire de protéines structurales elles-mêmes fixées sur l'actine. Ces protéines peuvent être : (1) l' $\alpha$ -actinine, qui interagit avec la zyxine (Reinhard *et al.*, 1999), et avec les protéines LIM-PDZ CLP-36 (Vallénus *et al.*, 2000), ALP (Xia *et al.*, 1997), et SmALP (Pomies *et al.*, 1999); (2) la  $\beta$ -tropomyosine, qui s'associe avec la protéine LIM-PDZ Enigma (Guy *et al.*, 1999); (3) la cofiline, qui interagit avec la protéine kinase LIMK-1 (Arber, 1998; Zigmond *et al.*, 1998).

La prédominance de la localisation des protéines LIM précédemment citées au niveau des microfilaments d'actine, ainsi que leur capacité à s'associer avec ces microfilaments, indiquent que l'association avec l'actine est fonctionnelle. De manière générale, il est admis que les protéines LIM, grâce à leur aptitude à diriger des interactions moléculaires variées, permettent le recrutement de protéines au niveau du cytosquelette.

De la même manière que les protéines LIM associées aux points d'adhésion focaux, les protéines LIM localisées le long des microfilaments d'actine semblent constituer des adaptateurs entre les kinases et le cytosquelette. C'est en particulier le cas pour les protéines LIM PDZ, qui s'associent d'une part au cytosquelette par l'intermédiaire de leur domaine PDZ, et d'autre part aux kinases par l'intermédiaire de leur(s) domaine(s) LIM. Ainsi, la tyrosine kinase Ret reconnaît un des domaines LIM de la protéine Enigma (Wu *et al.*, 1996), tandis que la protéine kinase C se lie à chacun des domaines LIM de la protéine ENH (Kuroda *et al.*, 1996) et de la protéine ZASP/Cypher1 (Zhou *et al.*, 1999). Les protéines LIM présentes au niveau des microfilaments peuvent également constituer des substrats pour ces protéine-kinases, comme dans le cas de la protéine LIMK-1, qui peut être phosphorylée par la protéine-kinase PAK-1 (Arber, 1998).

Il est donc logique de penser que ces protéines LIM interviennent dans la régulation de la dynamique du cytosquelette, en constituant des points de contacts au niveau de l'actine pour une voie de transduction impliquant une cascade de phosphorylations. Les observations réalisées par Durick et collaborateurs (Durick *et al.*, 1998), démontrant que la protéine LIM-PDZ Enigma est impliquée dans l'assemblage de complexes protéiques associés à l'actine et essentiels pour la transmission du signal mitogénique Ret/Ptc-2, permettent de confirmer cette hypothèse. On peut également citer l'exemple de la protéine LIMK-1. Cette protéine peut être phosphorylée par la kinase PAK-1, une kinase impliquée dans le transfert d'un signal extracellulaire vers l'actine via le système de la GTPase Rac. Lorsqu'elle est ainsi activée, la protéine LIMK-1 permet la phosphorylation, et par conséquent l'inhibition, de la cofiline, une protéine étroitement liée à l'actine. Ce processus conduit à inhiber la dépolymérisation de l'actine, provoque l'accumulation de microfilaments et d'agrégats d'actine, et favorise la stabilisation du cytosquelette d'actine (Arber, 1998; Zigmond *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999a).

Les différents exemples qui viennent d'être cités indiquent donc que les protéines LIM associées aux microfilaments constituent des médiateurs importants de la réponse du cytosquelette d'actine à un signal extracellulaire.

### **C. Les protéines LIM présentant une double localisation intracellulaire nucléaire/cytoplasmique.**

Certaines protéines LIM ont une localisation exclusivement nucléaire lors de certaines étapes de développement, puis ont la capacité de migrer du noyau vers le cytoplasme au cours de la différenciation cellulaire.

#### **C1. Les protéines LIM CRP.**

Les protéines LIM CRP (Cystein Rich Protein) sont des protéines « LIM-only » musculaires. Les membres de cette famille protéique peuvent être retrouvés chez des organismes très divers : il s'agit des protéines CRP-1, identifiée initialement chez l'homme (Liebhaber *et al.*, 1990), CRP-2 / SmLIM caractérisée chez la caille (Weiskirchen *et Bister*, 1993), CRP-3 / MLP découverte chez le rat et le poulet (Arber *et al.*, 1994), Mlp60A et Mlp84B identifiées chez la drosophile (Arber *et al.*, 1994 ; Stronach *et al.*, 1996). Ces protéines sont cependant très conservées d'une espèce à une autre, et elles présentent des propriétés biochimiques et une distribution intracellulaire (noyau/cytoplasme) identiques.

Les protéines CRP sont généralement caractérisées par la présence de deux domaines LIM à leur extrémité C-terminale, séparés par un domaine inter-LIM plus long que celui trouvé chez la plupart des autres protéines LIM (45 à 58 acides aminés). Chaque domaine LIM est suivi à son extrémité C-terminale d'une séquence répétée de 12 acides aminés riche en glycine, et d'un signal potentiel de localisation nucléaire (NLS).

De nombreux travaux suggèrent que les protéines CRP sont impliquées dans les processus régulateurs liés à la différenciation des cellules musculaires. En raison de leur double localisation intracellulaire unique (Arber *et al.*, 1994 ; Arber and Caroni, 1996 ; Crawford *et al.*, 1994 ; Kong *et al.*, 1997 ; Sadler *et al.*, 1992), il est possible que ces protéines puissent intervenir à deux niveaux : au niveau structural, et/ou au niveau transcriptionnel.

Plusieurs travaux indiquent que les protéines CRP possèdent la capacité de s'associer à l'actine. Dans les myofibrilles, la protéine CRP-3/MLP s'accumule au niveau des disques Z séparant les sarcomères (Arber *et al.*, 1997 ; Stronach *et al.*, 1999). Comme l'une des fonctions majeures des disques Z est d'accrocher l'extrémité (+) des microfilaments d'actine, il a été proposé que la protéine CRP-3/MLP participe à cet accrochage. De plus, les protéines CRP interagissent directement avec des protéines structurales impliquées dans l'organisation des microfilaments d'actine, comme l' $\alpha$ -actinine ou la zyxine (Sadler *et al.*, 1992). Il a également été montré que la protéine CRP-3/MLP pouvait interagir avec la  $\beta$ -spectrine (Flick *et al.*, 2000). Les protéines CRP sont également présentes au niveau des points d'adhésion focaux (Sadler *et al.*, 1992).

L'ensemble de ces observations suggère que ces protéines LIM interviennent dans la formation de complexes multiprotéiques impliqués dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Weiskirchen *et al.*, 1995). Les protéines CRP peuvent contribuer, via leurs interactions avec des composantes du cytosquelette, à l'établissement de la cyto-architecture musculaire, et ainsi intervenir dans la différenciation des muscles. Des études génétiques menées chez la souris ont en effet montré que l'inhibition de l'expression du

gène *CRP-3 / MLP* provoque des modifications importantes dans la cyto-architecture du muscle cardiaque, ce qui conduit à la mort de l'individu (Arber et al., 1997).

Certaines protéines LIM CRP ont pu être détectées au niveau nucléaire. Récemment, des études ont permis de déterminer quelle était la fonction de la protéine *CRP3/MLP* dans le noyau des cellules musculaires. Il a été démontré que cette protéine est capable d'interagir avec des protéines basiques présentant des domaines de type « hélice-boucle-hélice » comme Myo D, la myogénine, Myf-5 et MRF4. Le rôle de *CRP3/MLP* serait donc ici de promouvoir la formation d'un complexe ayant un rôle capital dans la différenciation myogénique finale et de réguler l'expression de toute une batterie de gènes spécifiques aux muscles (Kong et al., 1997).

## **C2. Les protéines SLIM.**

Une autre catégorie de protéines LIM semble également impliquée dans le contrôle de la différenciation des cellules musculaires. Il s'agit de la famille des protéines SLIM, composée des protéines *SLIM-1, SLIM-2, SLIM-3* (Morgan et al., 1995 ; Morgan et Madgwick, 1996) et *SLIMMER*. Comme les protéines CRP, ces protéines sont des protéines «LIM-only», comportant dans leur séquence quatre domaines LIM associés à un doigt de zinc isolé. Dans les cellules des muscles squelettiques, ces protéines présentent une localisation exclusivement cytoplasmique, en association avec le cytosquelette d'actine et les points d'adhésion focaux. Seule la protéine *SLIMMER* possède la capacité de s'accumuler à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau.

Cette particularité de la protéine *SLIMMER* est due au fait qu'elle contient plusieurs séquences NSL (Nuclear Signal Localization) et une séquence putative d'export nucléaire, qui lui confèrent sa localisation nucléaire et sa capacité à transiter du noyau au cytoplasme. La localisation intracellulaire de la protéine *SLIMMER* dépend du stade de différenciation des cellules. Dans les myoblastes, la protéine *SLIMMER* a une localisation exclusivement nucléaire. Après la différenciation des myoblastes en myotubes, la protéine *SLIMMER* est exclusivement concentrée dans le cytoplasme. Ces observations suggèrent un rôle de la protéine *SLIMMER* dans la communication noyau-cytoplasme au moment de la différenciation cellulaire.

## **C3. Le cas particulier de la zyxine.**

Bien que la zyxine soit principalement présente au niveau du cytoplasme, elle possède une séquence putative d'export nucléaire, et est capable de transiter du noyau vers le cytoplasme (Nix et Beckerle, 1997).

Tandis que les protéines LIM CRP et la protéine *SLIMMER* présentent une phase nucléaire clairement détectable, la phase nucléaire de la zyxine est transitoire, et peut seulement être détectée indirectement, par exemple par l'utilisation d'anticorps dirigés vers le noyau (Nix et Beckerle, 1997), ou par le blocage du processus d'export nucléaire (Petit et al., 2000). Le fait que la zyxine, une protéine normalement cytoplasmique, puisse transiter du noyau vers le cytoplasme est considéré comme un exemple de communication entre ces deux compartiments.

### III. LES PROTEINES LIM VEGETALES.

Alors que plus d'une centaine de gènes LIM ont été identifiés chez les animaux, dont une trentaine uniquement chez le nématode *C. elegans*, seul une dizaine de gènes LIM végétaux ont pu être isolés. En outre, les caractéristiques, les propriétés et les fonctions des protéines LIM végétales sont encore mal appréhendées.

#### A. Les différentes protéines LIM végétales identifiées.

La protéine LIM de tournesol HaPLIM-1 est longtemps restée la seule protéine LIM végétale connue (Baltz et al., 1992). Très récemment, plusieurs autres protéines LIM végétales ont été caractérisées simultanément chez des plantes très différentes : chez le tournesol (Composée), chez le tabac (Solanacée), chez *Arabidopsis thaliana* (Crucifère), et chez le pin (Gymnosperme) (Tab.3). Ces découvertes laissent supposer qu'il reste certainement beaucoup de protéines LIM végétales non identifiées à ce jour.

Le tournesol est l'espèce chez laquelle les études sur les protéines LIM sont les plus nombreuses. Il a été démontré qu'il existe chez cette plante une famille multigénique de gènes LIM (Baltz et al., 1992). Seuls trois membres de cette famille ont pour l'instant été caractérisés. Il s'agit des gènes *HaPLIM-1* (Baltz et al., 1992) et *HaPLIM-2*, exprimés spécifiquement dans le pollen, et du gène *HaWLIM-1*, dont l'expression est généralisée à l'ensemble des tissus de la plante.

#### B. Les protéines LIM végétales sont des protéines «LIM-only» structurellement proches des protéines LIM CRP animales.

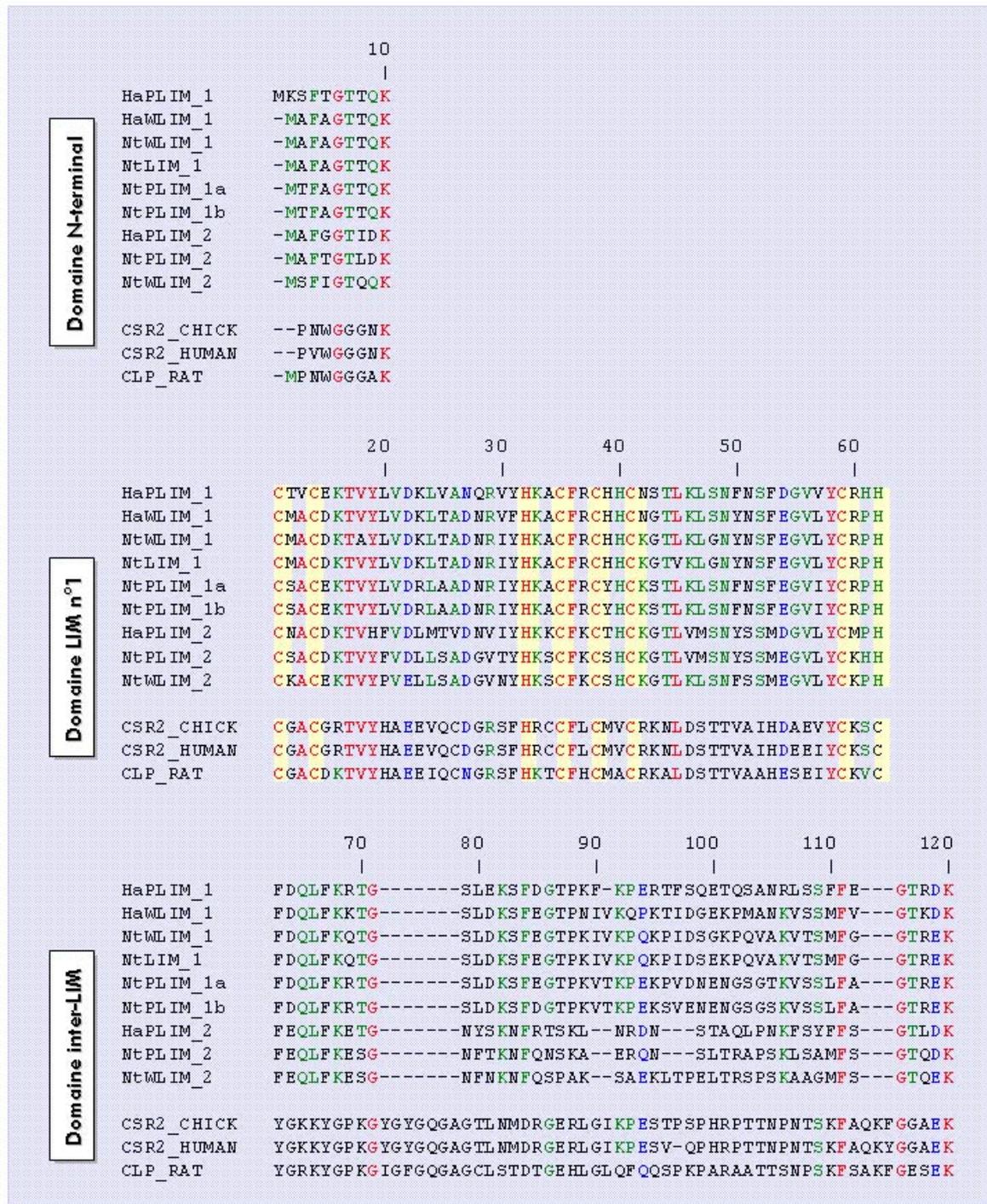
Il a été remarqué de très fortes homologies structurales entre l'ensemble des protéines LIM végétales caractérisées jusqu'à présent et les protéines LIM animales CRP (Fig. 4) Toutes ces protéines contiennent une extrémité N-terminale de taille réduite (de 9 à 10 acides aminés), deux domaines LIM de 52 acides aminés séparés par une région inter-LIM relativement longue (40 à 60 acides aminés), et une courte extrémité C-terminale.

Les similarités de séquences entre les protéines LIM animales CRP et les protéines LIM végétales diffèrent selon la région de la protéine considérée. L'alignement des séquences révèle que le degré de conservation au niveau des domaines LIM et de la région N-terminale est de 50 % (contre 30 % pour la région inter-LIM et la région C-terminale), ce qui suggère l'existence de similarités fonctionnelles entre les domaines LIM des protéines LIM végétales et des protéines LIM animales CRP.

Ces homologies de séquences ont permis de classer les protéines LIM végétales dans le groupe des protéines LIM CRP. Cette découverte permet d'élargir la famille des protéines LIM de type CRP, qui comportait jusqu'à présent des membres chez les vertébrés et chez les invertébrés, et renforce l'importance fonctionnelle de cette classe de protéines LIM.

Protéine	Type de séquence	n° d'accèsion	Références
<b>Toumesol (<i>Helianthus annuus</i> L.)</b>			
HaPLIM-1	ADNc	AF187104	Baltz & al., 1992a
	ADN génomique	X64392	Baltz & al., 1992a
HaPLIM-2	ADNc	AF047353	Baltz & al., 1998
	ADN génomique	AF116850	Eliasson & al., 1998
HaW LIM-1	ADNc	AF187105	Baltz & al., 1999
	ADN génomique	AF116849	Mundel & al., 1999
<b>Tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>)</b>			
NPLIM-1 a	ADNc	AF197567	Sweetman & al., 2000
	ADN génomique	AF184885	Eliasson & al., 1999c
NPLIM-1 b	ADNc	AF197568	Sweetman & al., 2000
NPLIM-2	ADNc	AF116851	Eliasson & al., 1999a
NPLIM-1	ADNc	AF184109	Eliasson & al., 1999b
NPLIM-2	ADNc	Y11002	Shen & al., 1997
	ADN génomique	AF184886	Gass & al., 1999
NPLIM-1	ADNc	AB023479	Kawaoka & al., 2000
<b>Arabette (<i>Arabidopsis thaliana</i>)</b>			
AtPLIM-2	ADN génomique	AC004665	Rounsey & al., 1998b
AtW LIM-1	ADN génomique	X74319	Eyrard & al., 1997
AtW LIM-2	ADN génomique	AF002109	Rounsey & al., 1998a
<b>Pin (<i>Pinus taeda</i> L.)</b>			
5N3D	séquence EST	*	Allona & al., 1998
5C7A	séquence EST	*	Allona & al., 1998
6C12H	séquence EST	*	Allona & al., 1998

**Tableau 3.** Les différents gènes LIM végétaux identifiés.



**Figure 4.** Alignement des séquences peptidiques de différentes protéines LIM végétales et de trois protéines CRP animales. HaPLIM-1, HaW LIM-1 et HaW LIM-2 : protéines LIM végétales identifiées chez le tournesol; NtPLIM-1a, NtPLIM-1b, NtPLIM-2, NtW LIM-1, NtW LIM-2 et NtLIM-1 : protéines LIM végétales identifiées chez le tabac; CSR-2 et CLP : protéines CRP animales. Les acides aminés identiques pour toutes les séquences apparaissent en rouge, les acides aminés conservés dans plus de la moitié des protéines en vert, et les acides aminés homologues en bleu. Les résidus histidine et cystéine impliqués dans la coordination des atomes de zinc sont indiqués en jaune. L'alignement multiple entre les différentes séquences a été réalisé à l'aide du programme « Clustalw1 » disponible sur le serveur d'Infobiogen ([www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr)).

	130	140	150	160	170	
HaPLIM_1	CNACAKIVYPI	ERVKVDGTAY	HRACFKCC	HGGCTISPS	NYIAHEGRL	YCKHH
HaW LIM_1	CLGCKNTVY	PTEKVSNGTAY	HKSCFKCS	HGGCTISPS	NYIAHEGRL	YCRHH
NtW LIM_1	CFGCKKTVY	PTEKVSNGTPY	HKSCFKCS	HGGCVISPS	NYIAHEGRL	YCKHH
NtLIM_1	CFGCKKTVY	PTEKVSANGTPY	HKSCFQCS	HGGCVISPS	NYIAHEGRL	YCKHH
NtPLIM_1a	CVGCTKTVY	PIEKVSNGTAY	HKACFKCS	HGGCTISPS	NYIAHEGRL	YCKHH
NtPLIM_1b	CVGCTKTVY	PIEKVSNGTAY	HKGCFKCS	HGGCTISPS	NYIAHEGRL	YCKHH
HaPLIM_2	CRICEKTVY	PIDKMTMEGESY	HKQCFRCV	HGGCPLTHSS	YAALNGL	YCRHH
NtPLIM_2	CAACDKTVY	PLBKVTMEGESF	HKSCFKCA	HGGCPLTHAT	YASLDGL	YCKHH
NtW LIM_2	CATCGKTAY	PLBKVTVENQSY	HKTCFKCS	HGGCSLSPS	NYAALNGL	YCKPH
CSR2_CHICK	CSRCGDSVY	AAEKVIGAGK	PWHKNCFR	CAKCGKSLE	STLTEKE	GHEIYCKGC
CSR2_HUMAN	CSRCGDSVY	AAEKIIGAGK	PWHKNCFR	CAKCGKSLE	STLTEKE	GHEIYCKGC
CLP_RAT	CPRCGKSVY	AAEKVMGGG	KPWHKTCF	PAICGKSLE	STNVTDK	DGELYCKVC

	180	190	200	210	220	230
HaPLIM_1	HIQLFKKKG	NYSOLEVEET	VAAAPAESE	TQNTETQNAE	TQNADTQNAD	TQNTETQNGSV
HaW LIM_1	HTQLIKEKG	NLSOLEGERS	-ARVGETAP	-----	-----	-----
NtW LIM_1	HIQLIKEKG	NLSKLEGDHE	-MNSTTTTE	VTAES-----	-----	-----
NtLIM_1	HIQLIKEKG	NLSKLEGDHE	-MNSTTTTE	VTAESYTAD	QVD-----	-----
NtPLIM_1a	HIQLFKKKG	NYSOLESDHE	-TDPALSTQ	SLT-----	-----	-----
NtPLIM_1b	HIQLFKKKG	NYSOLESDHE	-T-----	-----	-----	-----
HaPLIM_2	FAQLFLEKG	TLSHVLKAA	ADRKKNTIP	DHQABAEKV	PLPEQES-E	VBEKALEPQQEMQV
NtPLIM_2	FAQLFMEKG	NYQHVLKAA	NNKSSAAV	TPVNETEE	NAAEBENN	KEPEMAEBEPQQS--
NtW LIM_2	FSQLFKKKG	SYNHLLIKS	ASMKRPA	ATVPDS-----	-----	-----
CSR2_CHICK	YAKNFGPK	GFYGGAGAL	VHAQ-----	-----	-----	-----
CSR2_HUMAN	YAKNFGPK	GFYGGAGAL	VHAQ-----	-----	-----	-----
CLP_RAT	YAKNFGPT	GIGFGGLTH	QVEKKE-----	-----	-----	-----

	240	250		
HaPLIM_1	-----	-----		
HaW LIM_1	-----	-----		
NtW LIM_1	-----	-----		
NtLIM_1	-----	-----		
NtPLIM_1a	-----	-----		
NtPLIM_1b	-----	-----		
HaPLIM_2	EKVAETE	VES KLD	TTEVDD	EQESETV
NtPLIM_2	-----	-----		
NtW LIM_2	-----	-----		
CSR2_CHICK	-----	-----		
CSR2_HUMAN	-----	-----		
CLP_RAT	-----	-----		

Domaine LIM n°2

Domaine C-terminal

### **C. Les particularités des protéines LIM végétales par rapport aux protéines CRP animales.**

Bien que les protéines LIM végétales soient très proches des protéines CRP animales, elles diffèrent de ces dernières par quelques particularités structurales (Fig. 5). Les protéines végétales sont en effet dépourvues des domaines riches en glycine, qui suivent normalement chacun des domaines LIM dans les protéines CRP animales, ainsi que de la séquence NLS caractéristique de ces protéines. De plus, le deuxième doigt de zinc des domaines LIM des protéines LIM végétales diffère considérablement de celui des protéines LIM animales CRP : (1) un résidu histidine remplace la cystéine en tant que ligand de l'atome de zinc ; (2) il y a présence de 4 acides aminés entre les deux premières cystéines ; (3) la boucle du deuxième doigt de zinc est plus courte de deux acides aminés que celle du premier doigt de zinc.

Ces différences structurales, retrouvées chez des protéines LIM végétales relativement différentes du point de vue de leur séquence peptidique, pourraient représenter une particularité des protéines LIM végétales par rapport aux protéines LIM animales.

### **D. Fonction des protéines LIM végétales ?**

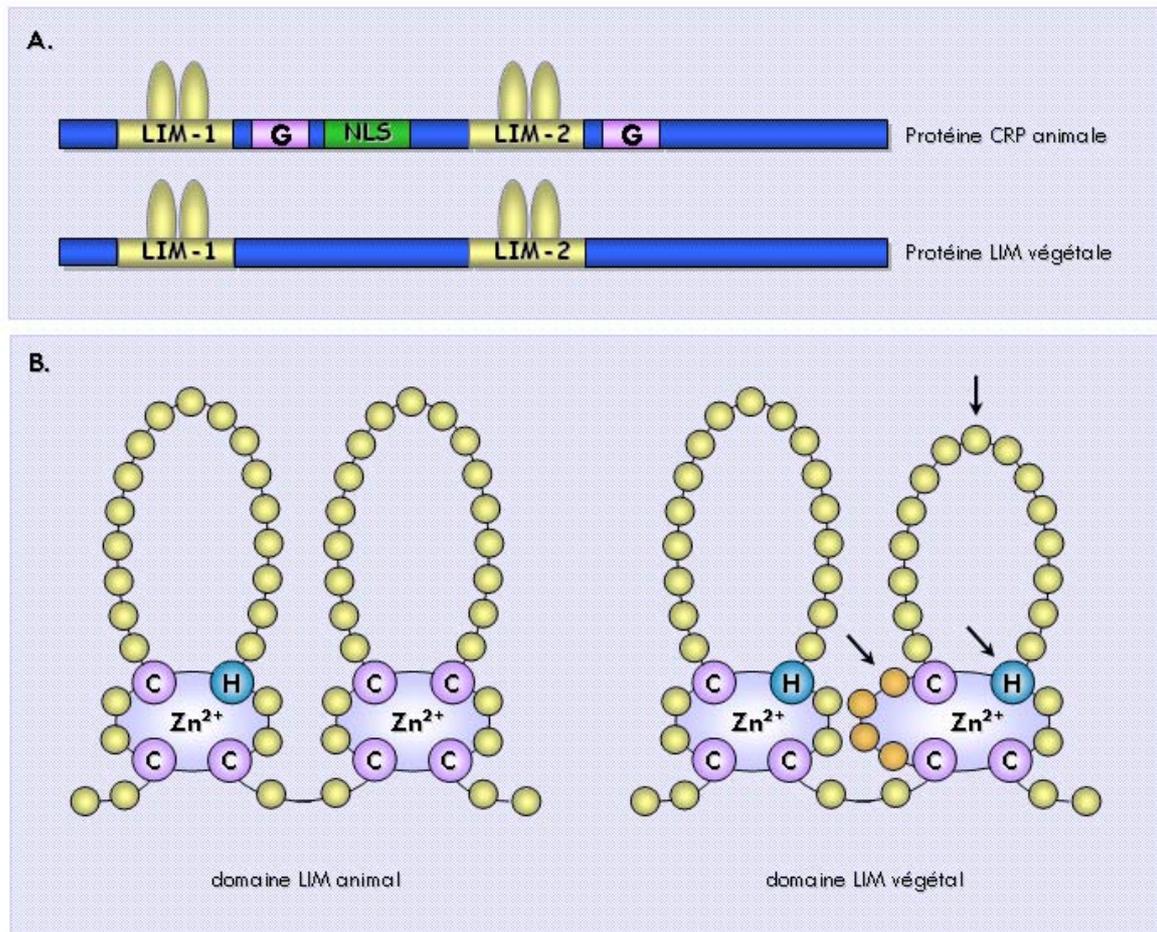
Les domaines LIM des protéines LIM végétales et des protéines CRP animales présentent un fort degré de similarité (environ 50 % - se reporter à la figure 4). De plus, certaines protéines LIM végétales, notamment la protéine HaWLIM-1, présentent la même double-localisation nucléaire/cytoplasmique que les protéines LIM CRP animales. On peut donc supposer que les protéines LIM végétales occupent des fonctions similaires aux protéines LIM CRP dans les cellules animales : une fonction au niveau cytoplasmique et une fonction au niveau nucléaire.

Plusieurs observations indiquent que les protéines LIM végétales, de la même manière que les protéines LIM CRP animales, sont étroitement associées avec le cytosquelette. Récemment, la protéine HaPLIM-1 a pu être détectée dans les grains de pollen matures au niveau des cônes de germination, région particulièrement riche en actine. De plus, la forme du marquage observé pour cette protéine est semblable à un site d'attachement à la membrane plasmique. Considérées conjointement, ces constatations permettent de suggérer que HaPLIM-1 est impliquée dans l'établissement des interactions actine-membrane plasmique, et régule de cette manière la croissance du tube pollinique (*Baltz et al., 1999*). De même, la protéine HaWLIM-1 est souvent associée avec les organelles liés aux membranes ou avec les vésicules, ce qui indique que cette protéine pourrait diriger l'attachement de ces structures au cytosquelette, et jouer ainsi un rôle dans le trafic intracellulaire. La détection de cette même protéine au niveau des phragmoplastes de cellules en division est également en faveur d'un rôle des protéines LIM végétales dans les interactions entre le cytosquelette et les membranes vésiculaires.

La protéine de tabac NtLIM-1 possède la capacité de se lier à l'ADN, via ses domaines LIM, au niveau d'une région promotrice de type PAL-box. La fixation de cette protéine

conduit à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes, et, au final, à la régulation du contenu en lignines de la plante (Kawaoka *et al.*, 2000). La protéine NtLIM-1 a donc clairement une fonction de facteur de transcription. La protéine de tournesol HaPLIM-1 possède également la capacité de se lier aux acides nucléiques, mais, contrairement à ce qui est observé dans le cas de la protéine NtLIM-1, aucune séquence spécifique de liaison n'a pu être mise en évidence sur l'ADN (Baltz *et al.*, 1996).

A ce jour, en raison d'un manque de preuves expérimentales, les fonctions des protéines LIM végétales restent encore, dans la plupart des cas, à l'état d'hypothèses. Des investigations supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de préciser la place occupée par ces protéines au sein de la cellule végétale.



**Figure 5.** Différences entre les protéines LIM animales et végétales.

**A.** Représentation schématique de la structure générale d'une protéine CRP animale et d'une protéine LIM végétale (LIM : domaine LIM; G : région riche en glycine; NLS : signal de localisation nucléaire potentiel); **B.** Représentation schématique du deuxième domaine LIM d'une protéine CRP animale et d'une protéine LIM végétale; les différences fondamentales apparaissant entre les deux domaines sont indiqués par une flèche. (d'après Mundel, 1998).

## CHAPITRE 1

# Etude de l'expression des gènes LIM dans les protoplastes de tournesol

Chez beaucoup d'organismes, et notamment chez les plantes, on peut observer la présence simultanée de plusieurs protéines LIM, très homologues au niveau structural, mais présentant des profils d'expression différents selon les tissus ou organes considérés. On suppose que ces protéines remplissent des fonctions similaires dans des tissus différents. Les divergences de séquences observées entre ces différentes protéines LIM pourraient leur permettre de s'exprimer spécifiquement dans un tissu donné.

Chez le tournesol, les tissus, selon leur nature (gamétophytiques ou sporophytiques), expriment des gènes LIM différents. L'expression de *HaPLIM-1* et *HaPLIM-2* est limitée à un organe particulier, le pollen, tandis que l'expression de *HaWLIM-1* est plus générale, puisqu'elle a été détectée dans l'ensemble des organes ou tissus végétaux analysés. L'expression de ces gènes dans des cellules isolées n'a par contre jamais été étudiée. Avant d'entamer une étude fonctionnelle des protéines LIM à l'aide de protoplastes, il s'avère donc nécessaire de déterminer quels sont les gènes (*HaPLIM-1*, *HaPLIM-2* et/ou *HaWLIM-1*) qui s'expriment dans ce type de cellule.

## **I. ETUDE PAR RT-PCR DE L'EXPRESSION DES GENES LIM DANS LES PROTOPLASTES DE TOURNESOL.**

La RT-PCR consiste à étudier l'expression d'un gène après rétrotranscription des ARN messagers (ARNm) issus du matériel choisi pour le travail, puis amplification par PCR du gène d'intérêt. L'extraction des ARNm est donc une étape limitante et déterminante dans la réalisation correcte de l'expérimentation.

Les protoplastes constituent un matériel végétal particulier : fragilité, difficulté d'obtention, petite taille font que ce type de cellule est rarement utilisé pour des études de biologie moléculaire. Ainsi, à notre connaissance, aucune méthode d'extraction d'ARN adaptée aux protoplastes de tournesol n'a été décrite. C'est pourquoi la mise au point d'un protocole d'extraction d'ARN sur notre matériel végétal est nécessaire.

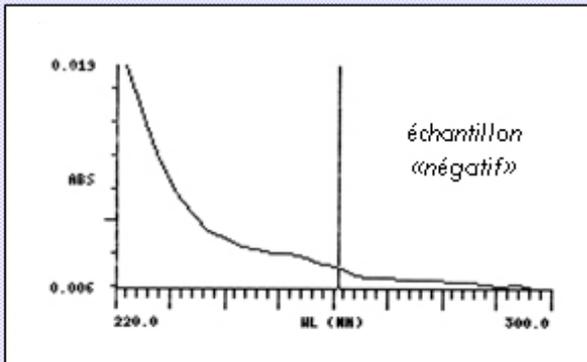
### **A. Mise au point d'une méthode d'extraction d'ARN à partir de protoplastes de tournesol.**

Différentes techniques d'extraction ont été appliquées sur les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, et comparées quant au rendement, à la pureté et à l'intégrité des ARN obtenus.

	Méthode n°1 Kit PolyA Tract System 1000	Méthode n°2 Extraction à l'aide de chlorure de lithium	Méthode n°3 Extraction à l'aide de CTAB	Méthode n°4 Extraction à l'aide d'isothiocyanate de guanidium
<b>Lyse des cellules</b>	SDS 0,25 %	SDS 1 %		SDS 1 %
<b>Dénaturation des complexes nucléoprotéiques</b>	guanidine thiocyanate 4 M SDS 0,25 %	phénol / chloroforme SDS 1 %	phénol / chloroforme / alcool isoamylique	guanidine thiocyanate 5 M phénol / chloroforme
<b>Inactivation de l'activité RNase endogène</b>	EDTA 1 mM guanidine thiocyanate 4 M béta mercaptoéthanol 2 %	EDTA 10 mM	EDTA 20 mM béta mercaptoéthanol 0,2 %	EDTA 2 mM guanidine thiocyanate 5 M béta mercaptoéthanol 5 %
<b>Élimination des protéines contaminantes</b>	sondes oligo d(T) couplées à des micro-particules magnétiques biotinylées	phénol / chloroforme	phénol / chloroforme / alcool isoamylique isopropanol	phénol / chloroforme acide acétique 1 M acétate de sodium 3 M
<b>Élimination de l'ADN contaminant</b>	sondes oligo d(T) couplées à des micro-particules magnétiques biotinylées	chlorure de lithium 8 M et 2 M	traitement DNase	chlorure de lithium 2 M traitement DNase
<b>Référence</b>	Promega	De Vries & al., 1988	J. Kallerhoff, communication personnelle	Shepherd & al., 1983

**Tableau 4.** Les principales étapes des protocoles d'extraction d'ARN utilisés sur les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

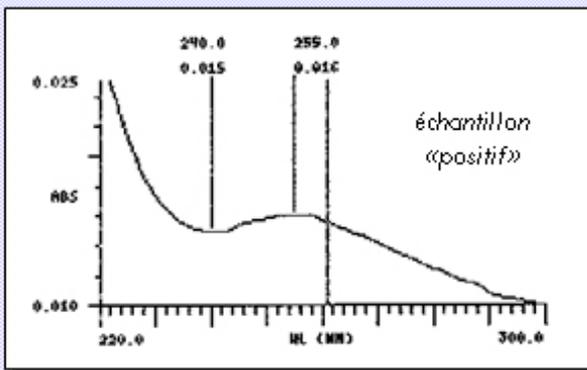
### Méthode n°1 : Kit PolyAtract System 1000



**Rendement :**

7.18 µg ARN / g MF

0.21 µg ARN / 1.10<sup>6</sup> protoplastes

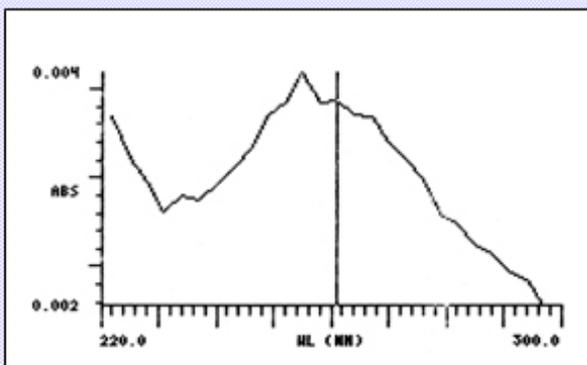


**Rapports DO :**

DO<sub>260 nm</sub> / DO<sub>230 nm</sub> = 0.52

DO<sub>260 nm</sub> / DO<sub>280 nm</sub> = 1.12

### Méthode n°2 : Extraction à l'aide de chlorure de lithium



**Rendement :**

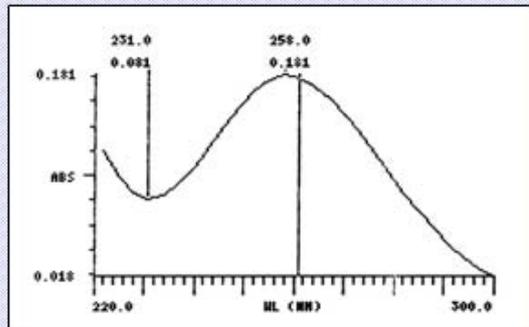
7.4 µg ARN / g MF

0.22 µg ARN / 1.10<sup>6</sup> protoplastes

Figure 6. Quantification et estimation de la qualité des ARN par spectrophotométrie.

**Méthode n°3 : Extraction à l'aide de CTAB**

sans traitement DNase



**Rendement :**

**306.24** µg ARN / g MF

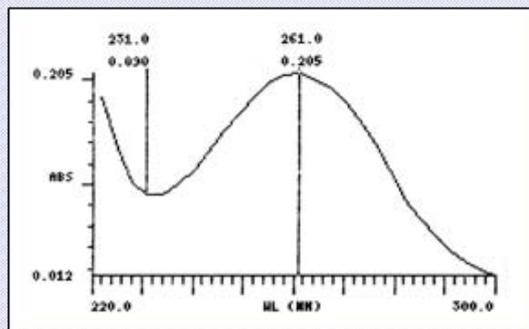
**9.18** µg ARN /  $1.10^6$  protoplastes

**Rapports DO :**

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{230\text{ nm}} = 1.98$

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}} = 1.6$

avec traitement DNase



**Rendement :**

**203.69** µg ARN / g MF

**6.11** µg ARN /  $1.10^6$  protoplastes

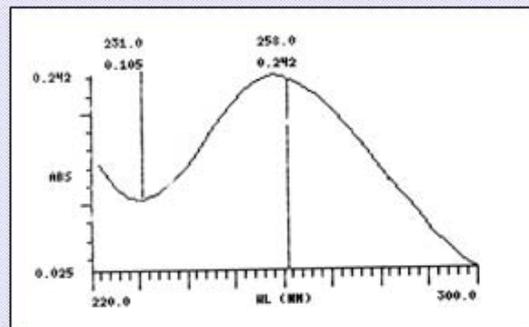
**Rapports DO :**

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{230\text{ nm}} = 2.69$

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}} = 1.54$

**Méthode n°4 : Extraction à l'aide d'isothiocyanate de ganidium**

sans traitement DNase



**Rendement :**

**90.66** µg ARN / g MF

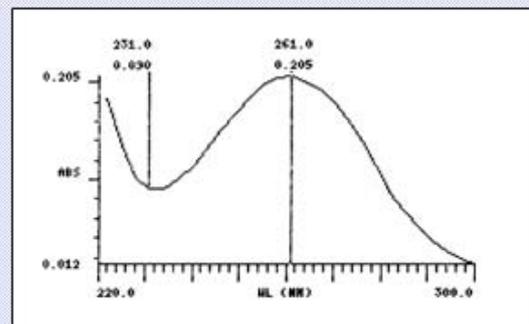
**2.71** µg ARN /  $1.10^6$  protoplastes

**Rapports DO :**

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{230\text{ nm}} = 2.08$

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}} = 1.72$

avec traitement DNase



**Rendement :**

**96.13** µg ARN / g MF

**2.88** µg ARN /  $1.10^6$  protoplastes

**Rapports DO :**

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{230\text{ nm}} = 2.71$

$DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}} = 1.54$

## **A1. Les différents protocoles d'extraction d'ARN utilisés sur les protoplastes de tournesol.**

La purification d'ARN intacts et de bonne qualité nécessite de respecter les points suivants : (1) la lyse totale des cellules, et notamment la dégradation de la membrane nucléaire (2) la dénaturation des complexes nucléoprotéiques (3) l'inhibition de l'activité RNase endogène (4) et enfin la purification des ARN par rapport aux contaminants d'ADN ou de protéines. Les protocoles présentés ci-après suivent différentes procédures pour réaliser ces étapes (Tab.4).

▶ Méthode n°1 : Extraction des ARNm à l'aide du kit PolyAtract System 1000 (Promega). Le principe de ce kit est basé sur l'utilisation de micro-particules magnétiques couplées à une sonde oligo d(T) biotinylée, qui permettent de purifier sélectivement les ARN poly (A) +. Cette méthode d'extraction est simple et rapide, puisque plusieurs étapes contraignantes, comme les extractions au phénol / chloroforme, ou les précipitations à l'éthanol ou au chlorure de lithium, sont supprimées. Ce kit est particulièrement adapté aux extractions d'ARNm à partir de cellules animales en culture. Il peut donc éventuellement convenir aux protoplastes, des cellules végétales sans paroi, comparables de ce fait aux cellules animales.

▶ Méthode n°2 : Extraction des ARN totaux à l'aide de chlorure de lithium (*De Vries et al., 1988*).

Cette méthode est basée sur l'utilisation de chlorure de lithium, un composé précipitant spécifiquement les ARN, dans la plupart des étapes de l'extraction. Elle est utilisée chez de nombreuses plantes pour des extractions à partir de tissus variés. Cependant, elle n'a jamais été employée sur le tournesol, ni sur des protoplastes.

▶ Méthode n° 3A et 3B : Extraction des ARN totaux à l'aide d'hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), suivie ou non d'un traitement à la DNase.

▶ Méthode n°4A et 4B : Extraction des ARN totaux à l'aide d'isothiocyanate de guanidium (*Shepherd et al., 1983*), suivie ou non d'un traitement à la DNase.

Ce protocole est utilisé en routine chez le tournesol pour les extractions d'ARN à partir de plusieurs types de tissus : racines, feuilles, tiges...Il n'a cependant jamais été employé sur les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

L'efficacité et la fiabilité de ces différents protocoles pour extraire des ARN à partir de protoplastes d'hypocotyles de tournesol ont été évaluées par la réalisation de plusieurs contrôles.

## **A2. Quantification et estimation de la qualité des ARN par spectrophotométrie.**

L'analyse de la préparation d'ARN à l'aide d'un spectrophotomètre permet d'obtenir rapidement une première évaluation de la quantité et de la qualité des ARN extraits (se reporter au Chapitre « Matériels et Méthodes »). La figure 6 permet de comparer les

différents protocoles d'extraction utilisés sur les protoplastes en terme de rendement et de qualité.

La méthode n°1 semble peu efficace sur les protoplastes de tournesol. Sur 21 extractions réalisées, seules 4 conduisent à l'obtention d'ARN (échantillons « positifs »). Ce protocole a ainsi un taux de réussite de 14.2 %, ce qui est insuffisant pour une utilisation en routine. Le rendement global en ARN reste très faible ( seulement 7.18 µg d'ARN / g MF), et les rapports calculés à partir des densités optiques indiquent que les ARN sont co-purifiés avec un grand nombre de contaminants. Cependant, il faut noter que le kit « PolyAtract System 1000 » ne permet d'extraire que les ARNm. Or ces derniers ne représentent qu'une faible part des ARN totaux. Il est donc possible que des ARNm aient été présents en faible quantité dans les échantillons analysés, mais que la sensibilité du spectrophotomètre n'ait pas permis de les détecter.

L'utilisation de la méthode n°2 est également peu concluante. L'aspect du spectre d'absorption indique que les ARN obtenus à la suite de ce protocole d'extraction sont de qualité très médiocre. Le rendement en ARN est en outre extrêmement faible (7.4 µg d'ARN / g MF).

Les deux dernières méthodes d'extraction d'ARN testées sur les protoplastes sont par contre particulièrement efficaces. Ainsi, les ARN extraits selon la méthode n°3 semblent de très bonne qualité. Les ratios  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$  et  $DO_{260nm} / DO_{230nm}$  sont corrects et les spectres d'absorption ont un profil pratiquement parfait. Les rendements en ARN sont en outre excellents (306.24 et 203.69 µg d'ARN / g MF). On peut noter que le rendement en ARN de la méthode n°3A (sans traitement à la DNase) est nettement plus élevé que le rendement de la méthode n°3B (avec traitement à la DNase). Il y a donc eu une sur-estimation de la quantité réelle en ARN en raison de la présence d'ADN contaminant, l'ADN et l'ARN présentant un maximum d'absorption à la même longueur d'onde (260 nm).

De la même manière que précédemment, les ARN obtenus par la méthode n°4 sont de très bonne qualité. Le rendement final en ARN est cependant plus faible que dans le cas de la méthode n°3 (90.66 et 96.13 µg d'ARN / g MF). On n'observe pas ici de différence de rendement entre une extraction suivie d'un traitement à la DNase et une extraction sans traitement à la DNase. Ce protocole, qui comporte plusieurs étapes de sélection au chlorure de lithium (précipitant spécifiquement les ARN), permet donc de limiter la présence d'ADN contaminant dans la solution finale.

Parmi l'ensemble des protocoles d'extraction d'ARN utilisés sur les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, deux méthodes semblent particulièrement intéressantes. Il s'agit de la méthode n°3 et de la méthode n°4, qui permettent d'obtenir des ARN en quantité importante. Avant de pouvoir utiliser l'une ou l'autre de ces techniques en routine, il est cependant nécessaire de s'assurer de la qualité et de l'intégrité des ARN obtenus par séparation électrophorétique en gel d'agarose.

### **A3. Estimation de la qualité des ARN par électrophorèse.**

Les ARNm étant de tailles très hétérogènes ( de quelques centaines de bases à plusieurs kilo-bases), il est difficile de les visualiser sous forme de bandes individualisées sur un gel d'agarose. Un moyen détourné pour évaluer l'intégrité de ces ARNm est d'observer la

qualité des ARN ribosomiques (ARNr). Ceux-ci constituent en effet la catégorie d'ARN la plus fragile. Si les bandes correspondant à ces ARNr sont bien nettes et ne présentent pas de traînées, c'est à dire si les ARNr ne sont pas dégradés par les endonucléases, on peut considérer que les ARNm sont également intacts. Chez les plantes, les ARNr 18 S ont une taille de 1.7 kb, les ARNr 35 S de 3.3 kb. On estime que la préparation d'ARN est de bonne qualité lorsqu'on a deux fois plus d'ARN 35 S que d'ARN 18 S.

De façon générale, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, on retrouve les deux bandes correspondant aux ARNr (Fig. 7). Par contre, l'intensité de ces bandes varie selon les méthodes d'extraction, ce qui révèle une variation dans les quantités respectives en ARN. Lorsque l'ARN n'a pas été traité avec une DNase, on remarque la présence d'une bande d'environ 10 kb sur le gel, indiquant la présence d'ADN résiduel de haut poids moléculaire.

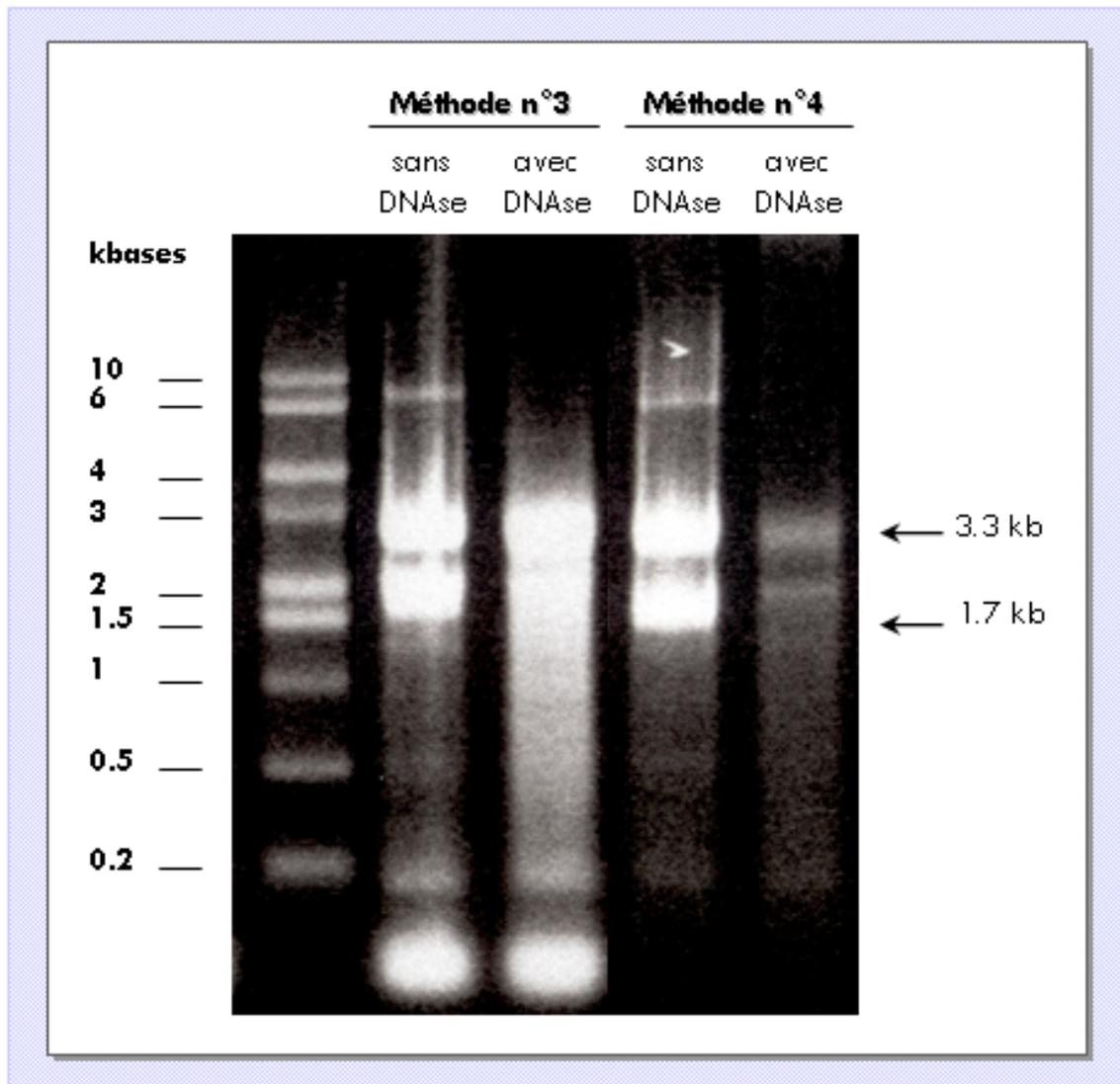
Dans le cas de l'utilisation de la méthode n°3, on peut de plus observer une traînée sur la partie du gel correspondant aux hauts poids moléculaires lorsque l'échantillon d'ARN n'est pas traité à la DNase. Cette traînée indique la présence d'ADN résiduel dans la préparation. Lorsque l'échantillon est traité à la DNase, on peut toujours observer les 2 bandes des ARNr, mais celles-ci sont beaucoup moins nettes et précises. De plus, on constate la présence d'une fluorescence diffuse au bas de la piste, indiquant la présence de produit de dégradation des ARN. La méthode n°3 permet donc d'extraire de grandes quantités d'ARN à partir des protoplastes de tournesol, mais ceux-ci sont très dégradés.

Dans le cas de l'utilisation de la méthode n°4, lorsque l'échantillon d'ARN n'est pas traité à la DNase, il reste de l'ADN, malgré les lavages et les précipitations au chlorure de lithium intégrés dans le protocole. On visualise en effet des traînées dans la partie du gel correspondant aux hauts poids moléculaires, ainsi que des bandes surnuméraires de grandes taille (aux alentours de 10 kb). Lorsque l'échantillon d'ARN est traité à la DNase, les deux bandes d'ARNr sont bien visibles. Il n'y a pas de traînées sur ces deux bandes, ni de fluorescence diffuse au bas de la piste: les ARN n'ont donc pas été dégradés. Cette méthode d'extraction permet donc d'obtenir des ARN en quantité moyenne, mais ces ARN sont intacts et de bonne qualité.

La méthode d'extraction d'ARN la plus efficace sur les protoplastes d'hypocotyle de tournesol est donc la méthode n°4B, à savoir la méthode d'extraction utilisant de l'isothiocyanate de guanidium. Un traitement à la DNase est indispensable pour éliminer l'ADN résiduel. Les ARN totaux obtenus par cette méthode sont de bonne qualité et en quantité suffisante. Cependant, les très faibles quantités d'ADN ne pouvant pas être détectées sur gel d'agarose, un dernier contrôle s'avère nécessaire afin de s'assurer de l'absence totale d'ADN génomique dans la solution d'ARN finale.

#### **A4. Contrôle de la présence d'ADN contaminant par PCR.**

Une contamination par de l'ADN génomique devient problématique dans le cas où les ARN sont utilisés pour étudier l'expression de gènes par RT-PCR.



**Figure 7.** Estimation par électrophorèse de la qualité des ARN obtenus selon les différentes méthodes d'extraction testées. **Méthode n°3** : Extraction des ARN à l'aide de CTAB; **Méthode n°4** : Extraction des ARN à l'aide d'isothiocyanate de guanidium.

Il est en effet impossible de distinguer les amplifications réalisées à partir des ADNc (correspondant aux gènes exprimés à un instant et à un endroit donné) de celles effectuées à partir de l'ADN génomique (correspondant à l'ensemble des gènes constituant le génome).

Un contrôle par PCR peut permettre de s'assurer de la pureté de la solution d'ARN. En effet, l'ADN polymérase utilisée pour les réactions de PCR n'utilise pas l'ARN comme matrice. La présence d'un produit d'amplification après une PCR effectuée directement sur de l'ARN, sans transcription inverse préalable, révèle donc une contamination par de l'ADN.

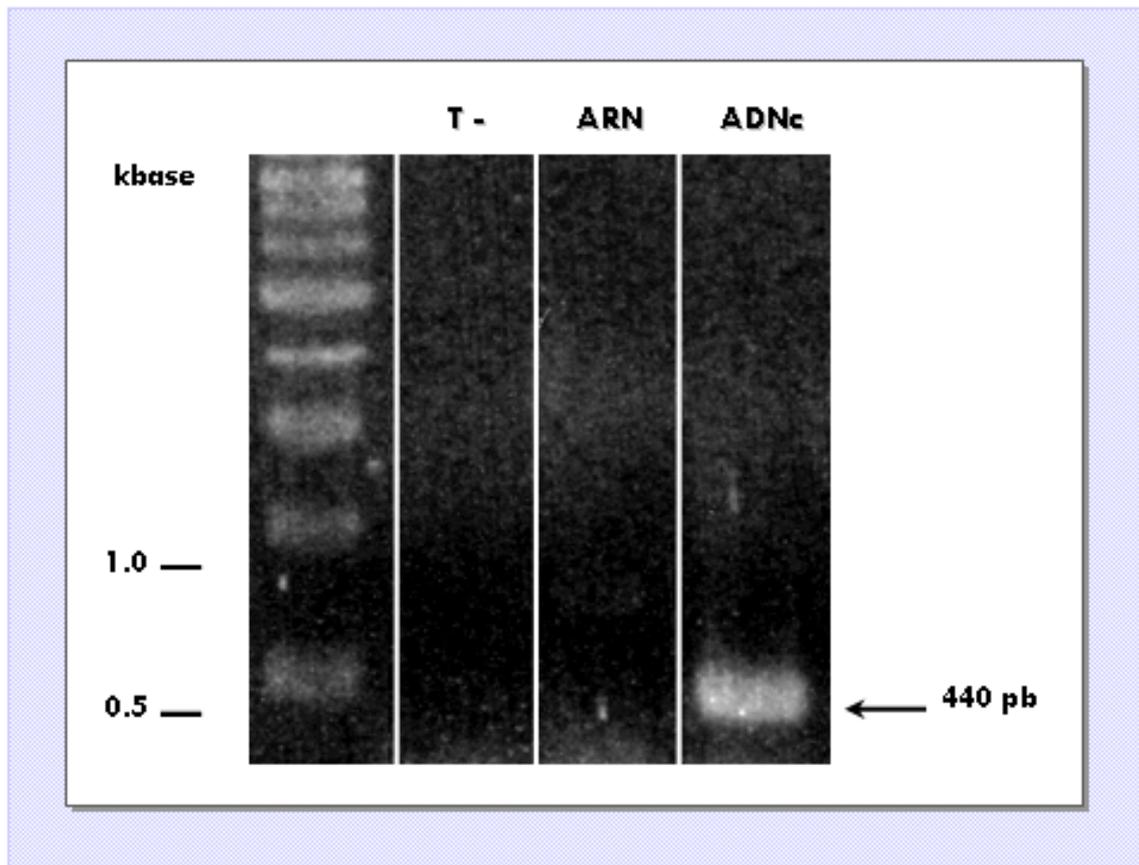
Afin d'évaluer la quantité d'ADN génomique présente dans la solution d'ARN obtenue selon la méthode n°4B, nous avons donc réalisé une PCR sur de l'ARN issu de protoplastes fraîchement isolés. Une seconde amplification, réalisée à partir de l'ADNc synthétisé à partir de cet ARN, constitue le témoin positif de la réaction. Nous avons utilisé des amorces spécifiques du gène de la calmoduline de tournesol (Courbou et al., 1997), qui sert ici de témoin interne. Ces amorces ont été choisies de part et d'autre d'un intron, ce qui permet de connaître l'origine du produit d'amplification. La taille théorique attendue pour le produit d'amplification obtenu à partir de l'ADN génomique est de 1.3 kb, et pour le produit d'amplification obtenu à partir de l'ADNc de 443 pb.

La figure 8 révèle l'absence d'amplification lorsque la PCR est réalisée à partir de l'ARN brut. Cette solution d'ARN ne contient donc pas d'ADN génomique contaminant, ou du moins pas suffisamment pour pouvoir observer une amplification. Les ARN obtenus selon la méthode d'extraction retenue peuvent donc être utilisés pour étudier par RT-PCR l'expression des gènes *HaPLIM-1*, *HaPLIM-2* et *HaWLIM-1* dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

## **B. Profil d'expression des gènes *HaPLIM-1*, *HaPLIM-2* et *HaWLIM-1* dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.**

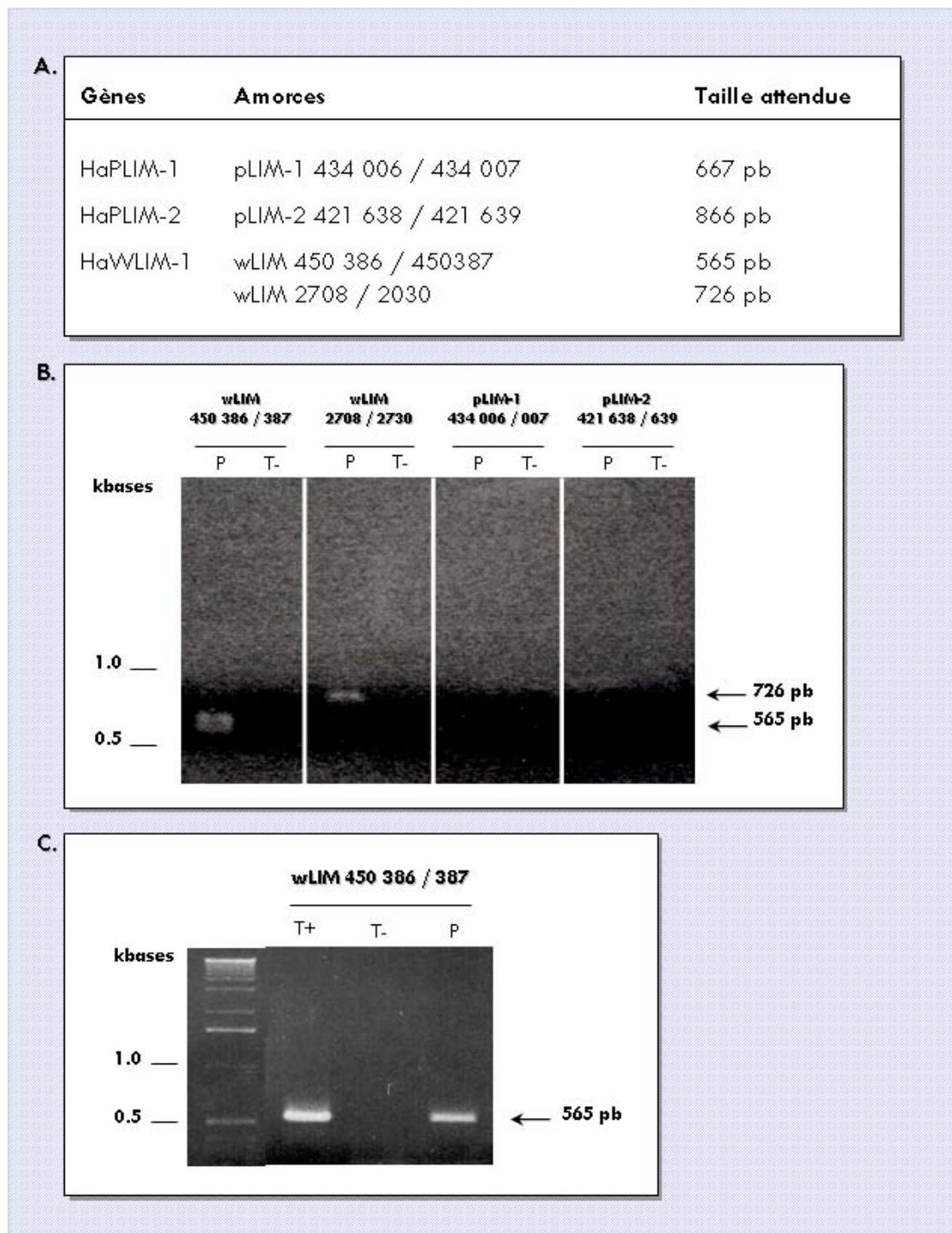
Afin d'établir le profil d'expression des gènes *HaPLIM-1*, *HaPLIM-2* et *HaWLIM-1* dans les protoplastes, une rétrotranscription des ARNm extraits des protoplastes selon la méthode précédemment définie a été réalisée. Les réactions d'amplification par PCR sur la matrice d'ADNc simple brin ainsi générée ont été effectuées à l'aide de couples d'amorces spécifiques de chacun des trois gènes (les séquences de ces amorces sont présentées dans le chapitre « Matériels et Méthodes », et leur localisation sur le gène correspondant est indiquée en Annexe n°1). Ces amorces ont été choisies sur la séquence du gène de part et d'autre de un ou de plusieurs introns, de façon à pouvoir différencier le produit d'une amplification sur l'ADNc de celui sur l'ADN génomique. Cela permet de s'assurer que le produit PCR obtenu après rétrotranscription des ARNm résulte d'une amplification sur le premier brin d'ADNc, et non sur de l'ADN génomique, contaminant possible de la préparation d'ARN.

Lorsque la PCR est réalisée à l'aide des amorces spécifiques des gènes *HaPLIM-1* et *HaPLIM-2*, on n'observe pas de produits d'amplification (Fig. 9B). Cette absence de bande sur le gel indique que les gènes *HaPLIM-1* et *HaPLIM-2* ne sont pas exprimés dans les protoplastes de tournesol.



**Figure 8.** Contrôle de la présence d'ADN contaminant par PCR.

PCR réalisée à l'aide d'amorces spécifique du gène de la calmoduline de tournesol sur un échantillon d'ARN de protoplastes de tournesol (ARN), ou sur les premiers brins d'ADNc synthétisés à partir de ces ARN (ADNc). La PCR est également effectuée sur un échantillon ne comportant pas de matrice (T-).



**Figure 9.** Profil d'expression des gènes HaPLIM-1, HaPLIM-2 et HaWLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

**A.** Amorces utilisées et taille attendue pour les produits d'amplification. **B.** PCR réalisée à l'aide des différents couples d'amorces spécifiques des gènes LIM de tournesol sur les premiers brins d'ADNc de protoplastes de tournesol (P). La PCR est effectuée également sur des échantillons ne comportants pas de matrice d'ADNc (T- : témoin négatif). **C.** PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques du gène HaWLIM-1 sur les premiers brins d'ADNc de protoplastes de tournesol (P). La PCR est également réalisée sur le clone d'ADNc correspondant au gène HaWLIM-1 (T+ : témoin positif), ainsi que sur des échantillons ne comportant pas de matrice d'ADNc (T- : témoin négatif).

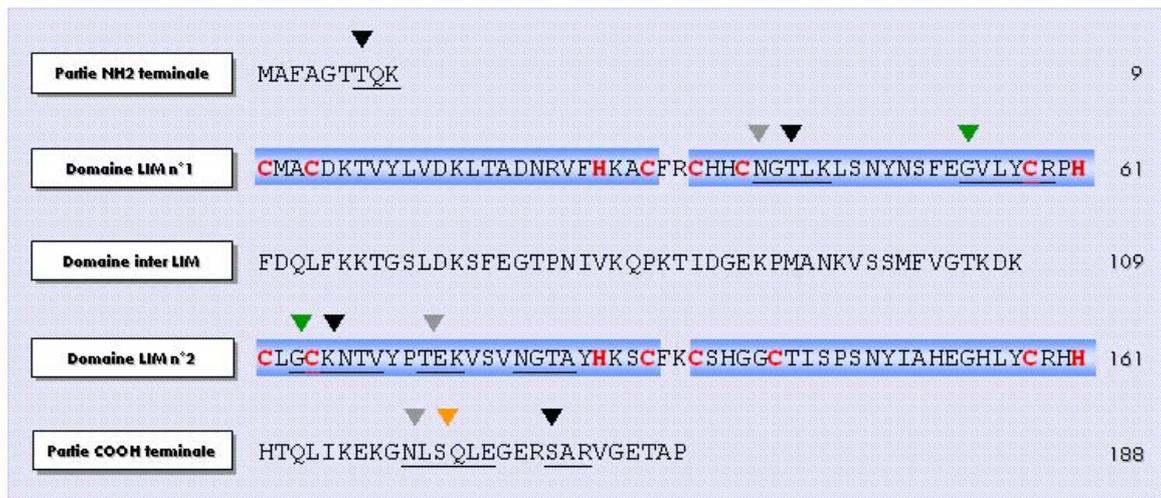
Par contre, on observe systématiquement la présence d'un produit d'amplification lorsque la PCR est réalisée à l'aide des amorces spécifiques du gène *HaWLIM-1*. Les séquences amplifiées ont une taille approximative de 600 pb pour le couple d'amorces wLIM 450 386 / 450 387, et de 700 pb pour le couple d'amorces wLIM 2708 / 2030. La taille observée pour ces couples d'amorces est en accord avec la taille prédite d'après la localisation des amorces sur la séquence nucléotidique de *HaWLIM-1* (Fig. 9A). Cependant, il est utile de remarquer que le couple d'amorces wLIM 2708 / 2030 ne permet pas, pour une raison qui reste à déterminer, l'obtention systématique d'un produit d'amplification à partir des ADNc de protoplastes. Nous avons donc retenu le couple d'amorces wLIM 450 386 / 450 387 pour la suite des expérimentations.

Dans le but de vérifier la spécificité des amplifications observées, une réaction de PCR utilisant les amorces wLIM 450 386 / 450 387 a été réalisée sur un clone d'ADNc correspondant au gène *HaWLIM-1*, utilisé ici comme témoin positif. La taille de la séquence amplifiée par ce moyen a ensuite été comparée avec la taille du produit d'amplification obtenu à partir des premiers brins d'ADNc de protoplastes de tournesol (Fig. 9C). Cette expérience a pu révéler que les deux produits d'amplification, d'origine différente, ont exactement la même taille, soit environ 600 pb. L'amplification observée sur les premiers brins d'ADNc de protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolés est donc bien spécifique du gène *HaWLIM-1*.

Le produit d'amplification correspondant à *HaWLIM-1* a ensuite été séquencé. Le séquençage a été réalisé sur les deux brins complémentaires du produit d'amplification, afin de « corriger » les éventuelles erreurs de réplication de l'ADN polymérase sur l'un ou l'autre brin. Un alignement global a ensuite été réalisé entre la séquence ainsi obtenue et la séquence codante du gène *HaWLIM-1* précédemment décrite par Mundel et collaborateurs (Mundel et al., 2000). Cet alignement a été réalisé successivement sur le brin 5'-3' et sur le brin 3'-5'.

Les résultats de ces deux alignements indiquent que la séquence nucléotidique du produit d'amplification est identique à 99 % à la séquence nucléotidique du gène *HaWLIM-1*. Ce produit d'amplification ne présente qu'un seul nucléotide qui diffère de la séquence originale (en position 243). Ce changement, très probablement dû aux lignées différentes de tournesol utilisées respectivement dans chaque étude (HA300 contre EMIL), conduit à la modification d'un seul acide aminé au niveau de la séquence protéique (remplacement d'une asparagine par une lysine en position 81).

Grâce à ces expériences de RT-PCR, nous avons déterminé que, parmi les gènes LIM caractérisés chez le tournesol, seul le gène *HaWLIM-1* s'exprime dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Les études réalisées précédemment par Mundel et collaborateurs (Mundel et al. 2000) révèlent que le gène *HaWLIM-1* présente un profil d'expression très large (feuilles, racines, tiges, tissus floraux...), ce qui suggère que la protéine *HaWLIM-1* a une fonction générale dans le fonctionnement cellulaire de base chez le tournesol. Le fait que le gène *HaWLIM-1* s'exprime également dans des cellules isolées comme les protoplastes renforce cette hypothèse.



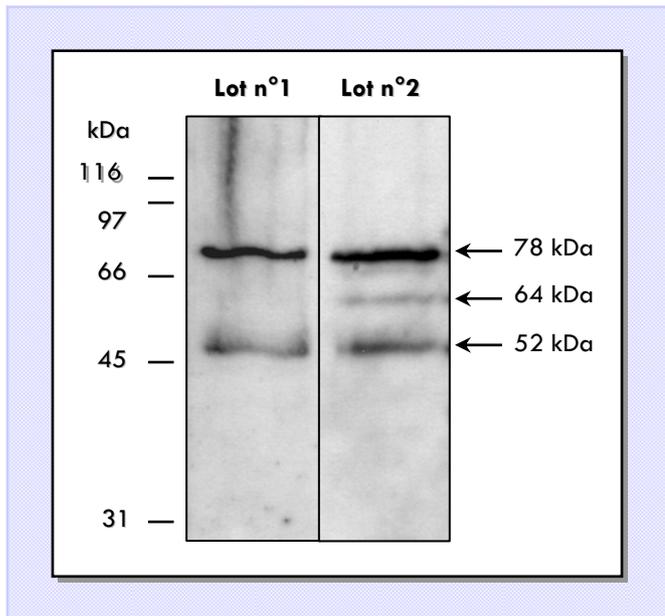
**Figure 10.** Structure de la protéine HaWLM-1.

Les cystéines et les histidines impliquées dans la coordination des atomes de zinc sont colorées en rouge. Les acides aminés constituant les doigts de zinc des différents domaines LIM sont surlignés en bleu. Sont également signalés les sites potentiels de N-glycosylation (▽), les sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C (▼), les sites potentiels de phosphorylation par la caseine kinase C (▼) et les sites potentiels de myristoylation (▽).

## II. ETUDE PAR WESTERN BLOT DE LA PROTEINE HaWLIM-1 DANS LES PROTOPLASTES DE TOURNESOL.

La protéine HaWLIM-1 est une protéine basique de 188 acides aminés, comportant deux motifs LIM séparés par une séquence de 48 acides aminés (Fig. 10). Le profil d'hydrophilicité de la protéine n'indique pas de domaines particulièrement hydrophobes pouvant correspondre à un peptide signal ou à un domaine transmembranaire. Les parties de la protéine situées aux extrémités NH<sub>2</sub> et COOH terminales à l'extérieur des domaines LIM sont très courtes et ne comportent aucun domaine fonctionnel identifiable. La recherche de motifs particuliers sur la séquence de la protéine HaWLIM-1 par comparaison avec la base de données PROSITE permet de mettre en évidence la présence de plusieurs sites de modifications post-traductionnelles : 3 sites potentiels de N-glycosylation (en position 41, 126 et 171), 4 sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C (en position 7, 43, 120 et 180), un site potentiel de phosphorylation par la caseine kinase (en position 173), et 2 sites potentiels de N-myristoylation (en position 54 et 112).

### A. Les anticorps polyclonaux spécifiques de la protéine HaWLIM-1 reconnaissent plusieurs polypeptides dans les protoplastes de tournesol.



**Figure 11.** Comparaison du profil protéique reconnu par les anticorps anti-HaWLIM-1 dans deux lots différents de protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

Les protéines totales de protoplastes fraîchement isolés sont extraites, séparées sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, puis mises en présence d'anticorps polyclonaux anti-HaWLIM-1. Le prélèvement des protoplastes s'effectue juste à la fin de leur isolement (**lot n°1**), ou une à deux heures après la fin de leur isolement (**lot n°2**).

La présence de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol a été recherchée par immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques. Les anticorps utilisés dans cette étude nous ont été aimablement fournis par C. Mundel (IBMP-Strasbourg). Il s'agit d'un sérum polyclonal obtenu à la suite de l'immunisation d'un lapin à l'aide de la protéine de fusion d'origine bactérienne HaWLIM-1-GST. Les anticorps sont appliqués à différentes concentrations, allant du 1 : 1000<sup>e</sup> au 1 : 100 000<sup>e</sup>. La concentration la plus adaptée pour la détection de protéines LIM dans les protoplastes est de 1 : 10 000<sup>e</sup> (Fig. 12A).

Les anticorps permettent alors la détection de deux polypeptides, dont les masses moléculaires sont respectivement de 52 kDa et 78 kDa. Il est à remarquer que, pour

certaines extraits protéiques, on peut également observer la présence d'un troisième polypeptide, de masse moléculaire égale à 64 kDa (Fig. 11). L'extraction des protéines s'effectue en principe sur des protoplastes prélevés juste à la fin de leur isolement, mais il peut arriver que, en raison de contraintes expérimentales, le prélèvement ait lieu seulement une ou deux heures après la fin de l'isolement. Cette différence pourrait expliquer l'apparition d'un troisième polypeptide, correspondant à la protéine HaWLIM-1, parmi les protéines totales de protoplastes. Ce phénomène sera expliqué plus précisément dans le Chapitre 3 de ce mémoire. Les expériences d'immunodétection présentées par la suite ayant été réalisées à partir de différents extraits protéiques de protoplastes, on pourra donc observer, selon les cas, la reconnaissance de deux ou trois polypeptides. La détection des polypeptides de 52 kDa et 78 kDa étant systématique, seule la présence de ces deux polypeptides sera analysée et discutée dans ce chapitre.

La spécificité de reconnaissance de ces différents polypeptides par les anticorps doit cependant être confirmée.

## **B. Le signal observé est spécifique.**

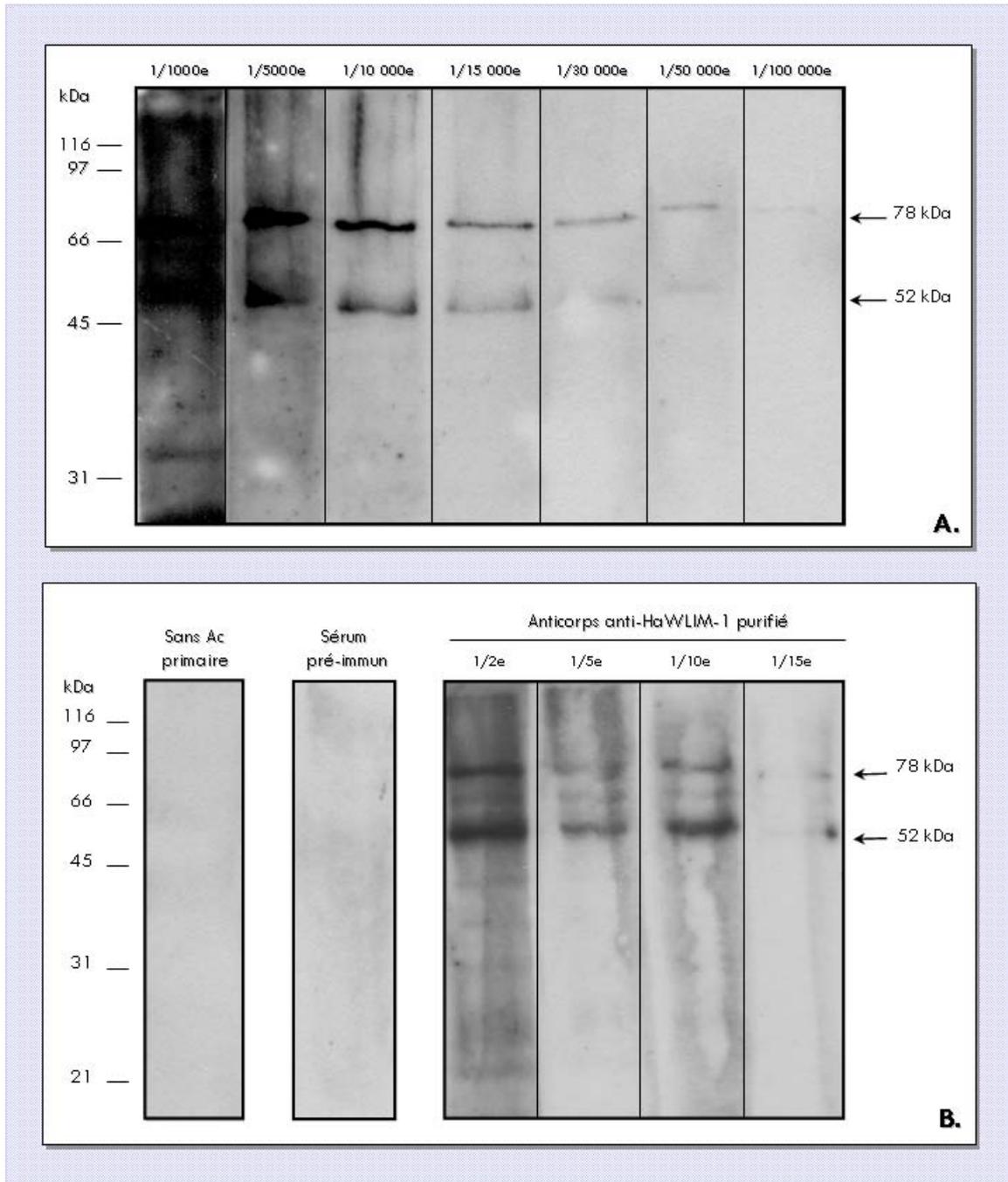
Mundel et collaborateurs (Mundel et al., 2000) ont démontré que le marquage obtenu avec le sérum anti-HaWLIM-1 peut être éteint si on pré-incube le sérum avec la protéine de fusion HaWLIM-1-GST avant de le mettre en présence des protéines végétales. Cette absence d'immunomarquage est révélatrice de la spécificité du sérum anti-HaWLIM-1. Cependant, les réactions immunocytochimiques, très complexes, étant susceptibles de conduire à des marquages non spécifiques, il est indispensable de multiplier les contrôles afin de s'assurer de la spécificité des anticorps utilisés.

Afin de vérifier que le protocole utilisé pour réaliser les immunodétections n'occasionnait pas de réactions parasites, la procédure a été réalisée en omettant les anticorps primaires. Une absence d'immunomarquage a été observée pour ce contrôle (Fig. 11B), indiquant que le protocole suivi n'est pas à l'origine d'artéfacts au niveau du marquage par les anticorps primaires.

Pour évaluer la part non spécifique du marquage obtenu avec le sérum anti-HaWLIM-1, une immunodétection a été réalisée en remplaçant le sérum anti-HaWLIM-1 par le sérum normal de lapin non immunisé. Ce sérum pré-immun a été utilisé à la même concentration que le sérum immun (1 : 10 000<sup>e</sup>).

La figure (Fig. 11B) indique que le sérum pré-immun ne reconnaît aucune protéine dans les protoplastes. Le marquage observé sur les protéines totales de protoplastes est bien dû aux anticorps anti-HaWLIM-1, produits par le lapin après son immunisation par la protéine de fusion.

L'immunisation de lapins avec la protéine de fusion HaWLIM-1-GST a permis l'obtention d'un sérum dont le spectre de reconnaissance est très large. Ce sérum contient des anticorps anti-HaWLIM-1, mais il contient très probablement en plus des anticorps dirigés contre la partie GST de la protéine de fusion.



**Figure 12.** Analyse par immunodétection de la protéine HaW LIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Les protéines totales de protoplastes fraîchement isolés sont extraites, séparées sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, puis mises en présence des anticorps. **A.** Anticorps anti-HaW LIM-1 polyclonaux non purifiés, appliqués à différentes concentrations. **B.** Contrôles de spécificité du marquage obtenus avec les anticorps anti-HaW LIM-1.

La séquence de la GST utilisée pour la construction de la protéine de fusion correspond à la GST de *Schistosoma japonicum* (Smith et Johnson, 1988), qui ne présente que peu d'homologies avec les GST végétales (environ 20 % d'homologie). Il est cependant possible que le sérum anti-HaWLIM-1 soit capable d'interagir avec les GST végétales.

Afin de s'assurer de l'absence de réactions croisées, le sérum a été purifié sur la protéine HaWLIM-1 isolée afin d'obtenir des anticorps spécifiquement dirigés contre la partie HaWLIM-1 de la protéine HaWLIM-1-GST. Le profil des protéines reconnues dans les protoplastes par ces anticorps purifiés est identique à celui reconnu par le sérum non purifié (Fig. 11B). Cette observation indique que le sérum non purifié ne reconnaît pas les GST végétales.

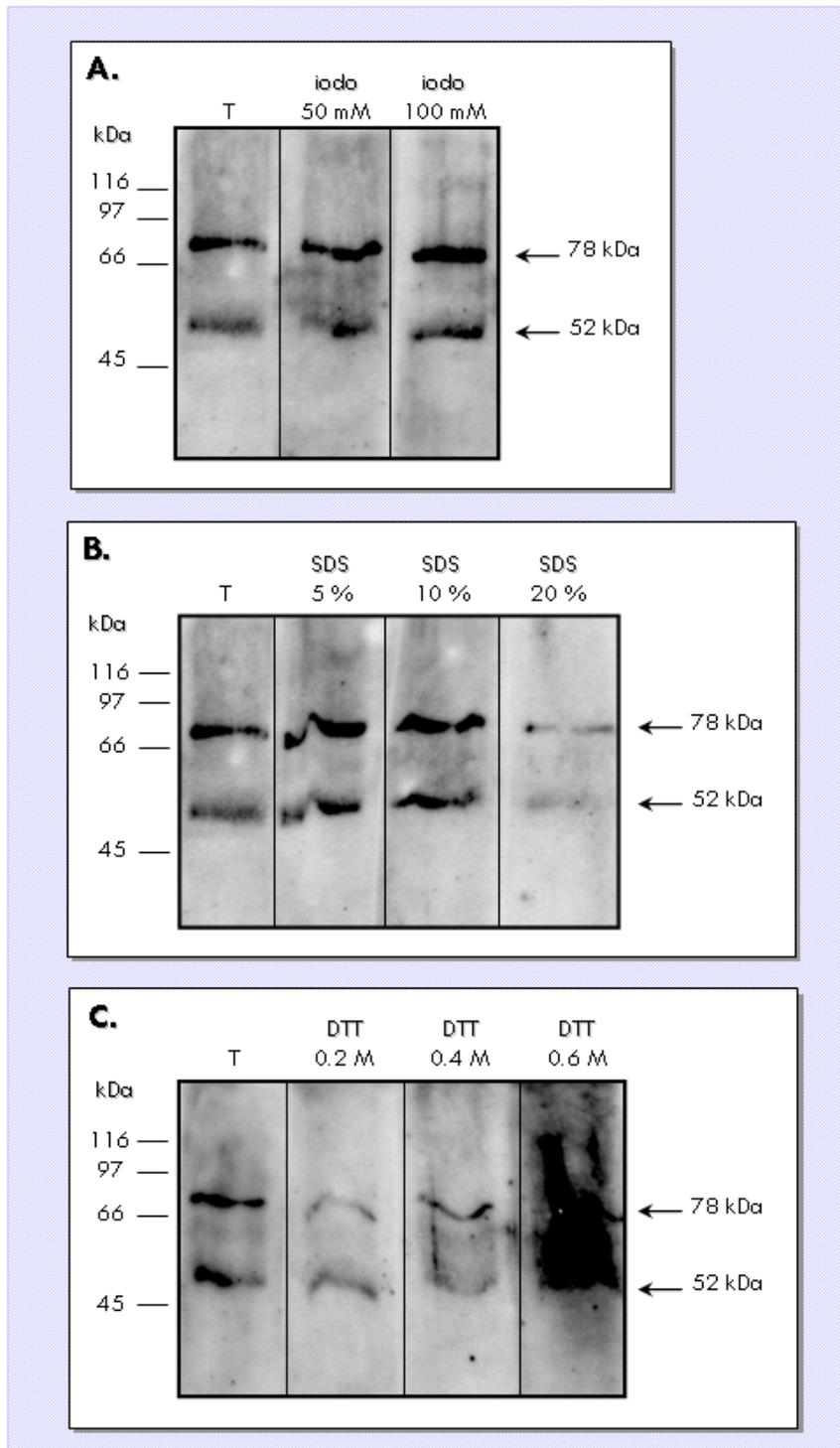
La spécificité du sérum anti-HaWLIM-1 a pu être confirmée par les différents contrôles réalisés. Les résultats obtenus lors de ces expériences nous permettent d'envisager l'utilisation du sérum anti-HaWLIM-1 non purifié comme sonde immunologique spécifique, de préférence aux anticorps purifiés, délicats à obtenir et beaucoup moins réactifs.

### **C. Implication de la protéine HaWLIM-1 dans des complexes protéiques ?**

Nous venons de voir que les anticorps anti-HaWLIM-1 reconnaissent spécifiquement dans les protoplastes fraîchement isolés deux polypeptides, de masses moléculaires égales à 52 kDa, et 78 kDa. Par contre, aucune protéine de 21 kDa, la masse moléculaire théorique de HaWLIM-1, n'est détectée. Les anticorps anti-HaWLIM-1 étant très spécifiques, il est peu probable qu'ils reconnaissent des protéines LIM différentes de HaWLIM-1 dans les protoplastes. Cette observation suggère que la protéine HaWLIM-1 n'est pas présente sous forme de monomères dans les protoplastes, mais est plutôt impliquée dans des structures moléculaires de hauts poids moléculaires.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, divers agents dénaturants ont été appliqués à fortes concentrations sur les extraits protéiques de protoplastes avant la réalisation de l'immunodétection. Le di-thio-treitol (DTT) permet de rompre les ponts di-sulfures s'établissant entre les protéines, le SDS est un détergent conduisant à la dissociation des complexes protéiques, alors que l'iodoacétamide (50 à 100 mM) réagit avec les groupes SH libres et forme avec eux une liaison covalente qui empêche la re-formation des ponts di-sulfure.

Ces divers traitements ne modifient en rien le profil de protéines reconnues par les anticorps (Fig. 13). Ces résultats suggèrent que les composants des polypeptides de 52 kDa et 78 kDa ne sont pas associés via des ponts di-sulfure, mais plutôt par l'intermédiaire d'autres types de liaison très stables, par exemple par l'intermédiaire de liaisons covalentes.



**Figure 13.** Dénaturation des protéines totales de protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

Les protéines sont dénaturées avant séparation électrophorétique par l'utilisation de divers agents dénaturants. **A.** Iodoacétamide; **B.** SDS; **C.** DTT. Les protéines sont ensuite immunodétectées à l'aide d'anticorps anti-HaW<sup>LIM-1</sup> polyclonaux appliqués à la concentration de 1 : 10 000e. (T.) Traitement dénaturant classiquement utilisé pour les protéines totales de protoplastes (se reporter à la rubrique « Matériels et Méthodes »).

### III. DISCUSSION.

Les gènes LIM précédemment caractérisés chez le tournesol, à savoir *HaPLIM-1*, *HaPLIM-2* et *HaWLIM-1*, présentent des profils d'expression variés au sein de la plante. L'expression de *HaPLIM-1* et *HaPLIM-2* est limitée à un organe particulier, le gamétophyte mâle, tandis que l'expression de *HaWLIM-1* est plus généralisée, puisqu'elle a été détectée dans l'ensemble des organes ou tissus végétaux analysés. L'expression de ces gènes dans des cellules isolées comme les protoplastes n'a par contre jamais été étudiée.

Par des approches de RT-PCR, nous avons déterminé que, parmi les gènes LIM précédemment cités, seul le gène *HaWLIM-1* s'exprime dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine *HaWLIM-1* permettent la détection de deux polypeptides distincts, dont les masses moléculaires sont respectivement de 52 kDa et 78 kDa. Ces masses moléculaires sont nettement supérieures à la taille attendue pour la protéine *HaWLIM-1*. L'application de divers traitements dénaturants sur les protéines totales de protoplastes avant la réalisation de l'immunodétection ne modifie en rien le profil des protéines reconnues par les anticorps, ce qui suggère que les composants des polypeptides détectés sont associés entre eux par l'intermédiaire de liaisons stables.

#### A. Seul le gène *HaWLIM-1* s'exprime dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

Le fait que seul le gène *HaWLIM-1* s'exprime dans les protoplastes n'a rien de surprenant. En effet, l'expression des gènes *HaPLIM-1* et *HaPLIM-2* n'a jusqu'à présent été détectée que dans le pollen, ce qui suggère une fonction très spécifique dans cet organe. Il a ainsi été suggéré que les protéines issues de ces gènes étaient impliquées dans la régulation de la croissance du tube pollinique (Baltz et al., 1999).

Le gène *HaWLIM-1* s'exprime par contre dans tous les tissus et organes de tournesol qui ont pu être analysés, y compris dans le pollen. Il semble donc que ce gène ait une fonction beaucoup plus universelle dans le fonctionnement cellulaire.

#### B. La protéine *HaWLIM-1* est présente sous plusieurs formes différentes dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

De façon surprenante, les masses moléculaires des polypeptides détectés dans les protoplastes à l'aide des anticorps spécifiques de *HaWLIM-1* sont nettement supérieures à la masse moléculaire théorique de la protéine *HaWLIM-1* (21 kDa). Ce même cas de figure a pu être observé dans d'autres tissus de tournesol, notamment dans les hypocotyles, les tiges, les pétales et le pollen, où seule la forme de 52 kDa a pu être détectée.

Deux données peuvent être considérées comme certaines : (1) la séquence codante de la protéine *HaWLIM-1* identifiée par Mundel et collaborateurs (Mundel et al., 2000) code pour une protéine d'environ 21 kDa ; (2) les anticorps polyclonaux utilisés pour cette étude ont été produits contre cette protéine de 21 kDa. Comment alors expliquer que ces anticorps ne reconnaissent pas de polypeptide de 21 kDa dans les tissus de tournesol, et

que seuls des polypeptides de taille supérieure soient détectés ? Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat.

### **Présence de modifications post-traductionnelles ?**

Il est très probable que la protéine HaWLIM-1 n'existe pas dans les cellules végétales sous la forme de 21 kDa, qui correspond à la taille théorique déduite de la séquence de la protéine. Cette protéine doit certainement subir quelques modifications post-traductionnelles, afin d'être fonctionnelle dans les cellules végétales. Il existe sur la séquence de la protéine HaWLIM-1 de nombreux sites potentiels de glycosylation et de méristoylation (Fig. 10). On peut donc imaginer la présence de modifications post-traductionnelles sur la protéine HaWLIM-1. Les deux polypeptides détectés en immunoblot correspondraient alors à une seule et même protéine, présentant deux formes d'épissage différentes.

Cependant, il est difficile d'imaginer la présence de tant de résidus glycosyl sur une protéine si petite pour plusieurs raisons : (1) il y a peu d'acides aminés glycosylables sur la molécule (seulement trois sites identifiés) ; (2) si la protéine portait tant de résidus glycosyl, les différentes fonctions portées par la séquence protéique seraient totalement masquées ; (3) les longues chaînes glycosylées sont seulement présentes- ou n'ont été détectées que – dans les protéines excrétées de type protéoglycanes. Or, les expériences d'immunocytolocalisation réalisées par Mundel et collaborateurs indiquent clairement que la protéine HaWLIM-1 est intracellulaire.

Ainsi, les modifications post-traductionnelles, comme des glycosylations ou les méristylations, ne permettent pas d'expliquer à elles seules l'importance des masses moléculaires observées pour les différents polypeptides.

### **Implication de la protéine HaWLIM-1 dans des interactions protéiques stables ?**

Lors des expériences d'immunoblot, la forme monomérique de la protéine HaWLIM-1, de masse moléculaire théorique égale à 21 kDa, n'a jamais pu être détectée, que ce soit en conditions natives ou en conditions dénaturantes. On peut donc supposer que la protéine HaWLIM-1 est présente dans les tissus de tournesol sous forme d'oligomères. L'implication de la protéine HaPLIM-1 (N. Gass, communication personnelle) ainsi que des protéines LIM animales de type CRP (Feuerstein et al., 1994) dans des processus d'oligomérisation ayant déjà été démontrée, l'hypothèse selon laquelle la protéine HaWLIM-1 pourrait-elle aussi être impliquée dans ce type d'association est tout à fait plausible. Cependant, le fait que des traitements utilisant des agents réducteurs comme le DTT ou l'iodoacétamide ne conduisent pas à la libération de la forme monomérique de HaWLIM-1 élimine la possibilité de l'implication de ponts di-sulfures dans la formation des complexes protéiques. On peut donc penser que la protéine HaWLIM-1 s'associe de façon stable, par exemple par l'intermédiaire de liaisons covalentes, avec son ou ses partenaires protéiques. La nature exacte de ces associations reste encore à déterminer.

Si on considère que la protéine HaWLIM-1 est effectivement impliquée dans un processus d'oligomérisation, les protéines qui lui sont associées peuvent être de nature très variée : ce pourrait être une deuxième molécule de la même protéine, une autre protéine LIM non identifiée, ou une autre protéine non LIM. Il sera nécessaire dans un avenir proche d'identifier les partenaires protéiques de la protéine HaWLIM-1. Dans cet objectif, des

expériences de co-immunoprécipitation et/ou de chromatographie par affinité peuvent être envisagées.

### **C. Quelles sont les fonctions des différentes formes de la protéine HaWLIM- dans les cellules végétales ?**

Dans les cellules animales, la plupart des protéines LIM connues sont engagées dans des interactions protéiques souvent multiples, et constituent des modules de liaisons pour la formation de complexes macromoléculaires. Il est donc plausible que le même cas de figure existe dans les cellules végétales.

Dans les protoplastes de tournesol, la protéine HaWLIM-1 n'a pu être détectée que sous la forme de polypeptides de 52 et 78 kDa, et, occasionnellement, sous la forme d'un polypeptide de 64 kDa. Dans les autres tissus et organes du tournesol, elle peut être présente sous différentes formes : une forme de 34 kDa – qui pourrait correspondre à la forme monomérique de la protéine - a pu être observée dans les ovaires immatures ; dans les hypocotyles, les tiges, et la plupart des organes floraux, seule la forme de 52 kDa est présente .

Une étude réalisée à partir d'ovaires prélevés à différents stades de développement indique que le profil des protéines reconnues par les anticorps spécifiques de HaWLIM-1 varie au cours de la maturation des ovaires. Dans les ovaires immatures, la forme monomérique est prédominante, tandis que dans les ovaires matures, seul le polypeptide de 52 kDa peut être observé . La conversion forme monomérique / forme dimérique pouvant être observée dans les ovaires au cours de leur développement ne peut pas être un événement spontané. Une activité enzymatique, régulée par le développement, pourrait être responsable de la conversion de la protéine HaWLIM-1 en complexes de masses moléculaires plus importante.

L'ensemble de ces observations suggère que la protéine HaWLIM-1 est dynamique, et qu'elle peut intervenir dans plusieurs complexes protéiques différents, dont la nature varie en fonction des organes considérés et en fonction du stade de développement.

## CHAPITRE 2

# Localisation de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes de tournesol

L'étude de l'expression des gènes LIM présentée au chapitre précédent a permis de révéler que seule la protéine HaWLIM-1 est présente dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Les expériences d'immunodétection indiquent en outre que cette protéine n'est pas présente sous forme de monomère dans ces cellules, mais semble plutôt impliquée dans au moins deux complexes multiprotéiques différents. Quelle peut être la fonction de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes, et, de façon plus générale, dans les cellules végétales ? La détermination de la localisation intracellulaire de cette protéine pourrait apporter quelques indications sur sa fonction potentielle. Afin de préciser cette localisation, nous avons marqué la protéine HaWLIM dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol par immunocytologie.

## **I. LA PROTEINE HAWLIM-1 PRESENTE UNE DOUBLE LOCALISATION DANS LES PROTOPLASTES.**

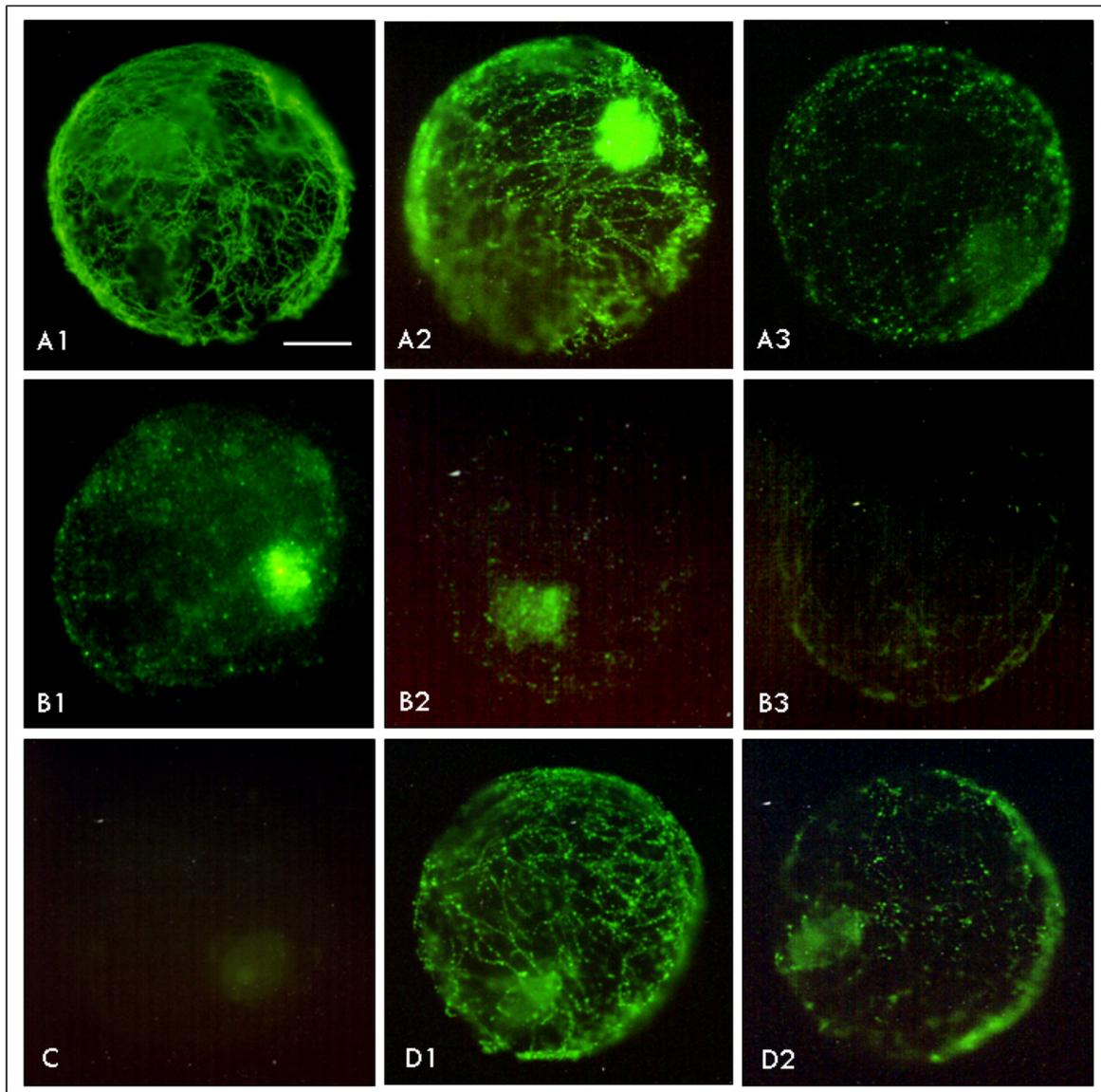
La protéine HaWLIM-1 est révélée dans les protoplastes de tournesol par l'application des anticorps polyclonaux anti-HaWLIM-1, associés à un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome, la fluorescéine. Les anticorps anti-HaWLIM-1 sont appliqués sur les protoplastes à des concentrations allant de 1 : 5000<sup>e</sup> à 1 : 15 000<sup>e</sup> (Fig. 14-A). La composante non spécifique du marquage est évaluée par la réalisation de plusieurs contrôles de spécificité: le premier témoin consiste à remplacer les anticorps par le sérum pré-immun utilisé aux mêmes concentrations (Fig. 14-B), le second à omettre l'anticorps primaire (Fig. 14-C), et le dernier à réaliser le marquage à l'aide de l'anticorps purifié sur la protéine HaWLIM-1 isolée (Fig. 14-D) (pour plus de détails sur ces témoins, se reporter au Chapitre 1).

La protéine HaWLIM-1 est ainsi détectée dans deux compartiments intracellulaires distincts : le noyau et le cytoplasme cortical.

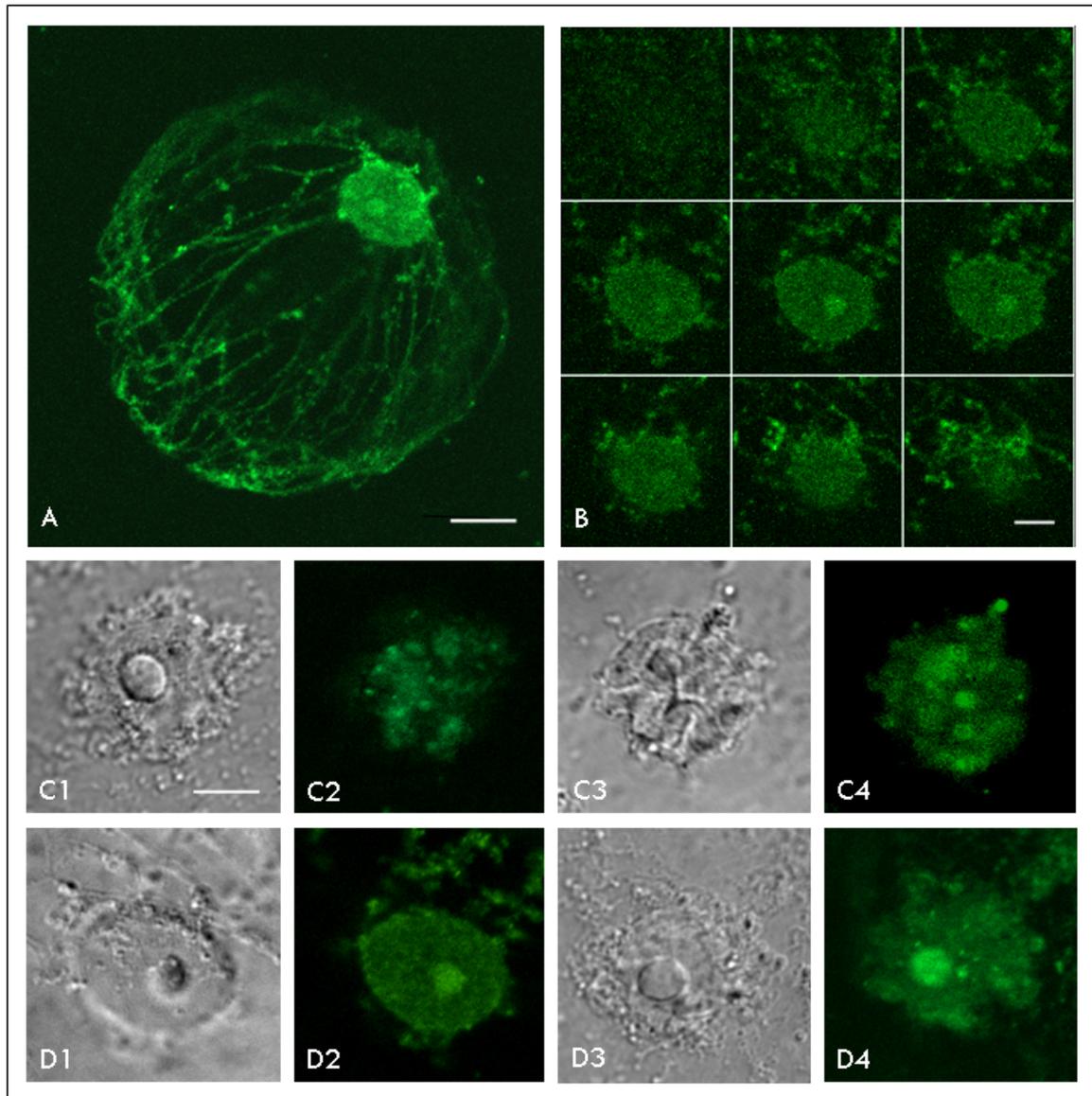
## **II. LES PROTEINES HaWLIM-1 NUCLEAIRES.**

### **A. Les protéines HaWLIM-1 nucléaires s'accumulent préférentiellement dans le nucléole.**

Le marquage nucléaire est particulièrement intense, mais il apparaît sous une forme diffuse. Il est donc délicat de déterminer la localisation exacte de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau. Afin d'apporter plus de précisions sur cette localisation, les protoplastes ont été observés en microscopie confocale (Fig. 15).



**Figure 14.** Immunocytochemical localisation de la protéine HaWLLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Marquage de protoplastes fraîchement isolés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-HaWLLIM-1 utilisés à la concentration de 1 : 5000e (A1), 1 : 7 000e (A2) ou 1 : 10 000e (A3). Afin de vérifier la spécificité de reconnaissance des anticorps, le marquage est également réalisé : à l'aide du sérum pré-immun correspondant utilisé aux mêmes concentrations, à savoir au 1 : 5000e (B1), 1 : 7000e (B2) ou 1 : 10 000e (B3); en omettant l'anticorps primaire dans la procédure (C); en utilisant les anticorps anti-HaWLLIM-1 purifiés par affinité sur la protéine HaWLLIM-1 isolée, non dilués (D1) ou à la concentration de 1 : 5e (D2). (Barre = 10  $\mu$ m).



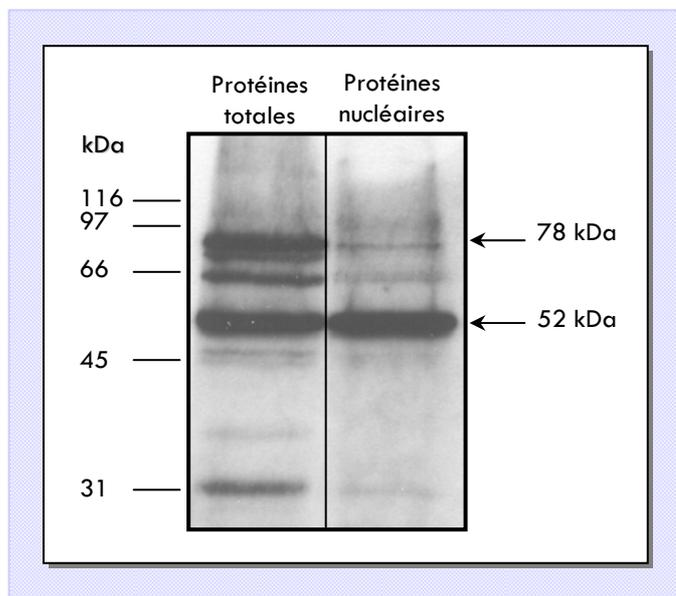
**Figure 15.** Immunocytochemical localization of the protein HaWLLIM-1 at the level of the nucleus of protoplasts of sunflower hypocotyls. Freshly isolated protoplasts are labeled with anti-HaWLLIM-1 antibodies or pre-immune serum at a concentration of 1 : 7000e, associated with a secondary antibody coupled with FITC. Confocal images of the nuclear region are taken. **A.** Confocal section of a protoplast (Barre = 10 µM); **B.** Series of confocal sections of nucleus (Barre = 2 µM); **C.** Nuclear labeling revealed by the pre-immune (Barre = 2 µM); **D.** Nuclear labeling revealed by anti-HaWLLIM-1 antibodies (Barre = 2 µM). (C1, C3, D1, D3) DIC images of protoplast nuclei.

Des sections optiques de la région nucléaire des protoplastes montrent que le marquage est localisé à la fois au niveau péri- et intranucléaire (Fig. 15-B). A l'intérieur du noyau, la fluorescence est diffuse, et présente une intensité beaucoup plus importante au niveau du nucléole (Fig. 15-D). Les protoplastes marqués à l'aide du sérum pré-immun présentent également une fluorescence diffuse à l'intérieur du noyau, mais celle-ci est cependant moins intense que dans le cas de l'utilisation des anticorps anti-HaWLIM-1. Par contre, le marquage au niveau du nucléole est absent (Fig. 15-C). Ces observations indiquent que le marquage spécifique de la protéine HaWLIM-1 au niveau du noyau est principalement localisé dans le nucléole.

Contrairement au marquage intranucléaire, le marquage péri-nucléaire n'est pas diffus. Il prend au contraire un aspect ponctiforme. Comme nous le verrons ultérieurement, ce marquage péri-nucléaire peut être assimilé au marquage observé au niveau cortical.

### B. Immunodétection de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

Les expériences d'immunocyto-localisation nous ont permis de déterminer que, dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, la protéine HaWLIM-1 présente une double localisation intracellulaire. Par ailleurs, les expériences d'immunodétection présentée dans le Chapitre 1 indiquent que l'utilisation des anticorps anti-HaWLIM-1 conduit à la détection de deux polypeptides distincts dans les protoplastes. Peut-on établir un lien entre ces deux observations ?



**Figure 16.** Immunodétection de la protéine HaWLIM-1 dans les noyaux des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

Les protéines totales et les protéines nucléaires sont extraites à partir de protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolés. Après séparation électrophorétique et transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont immunodétectées à l'aide d'anticorps anti-HaWLIM-1 appliqués à la concentration de 1 : 10 000e. L'immunodétection est réalisée sur 30 µg de protéines totales et sur 30 µg de protéines nucléaires.

Afin de déterminer la nature du ou des polypeptides présents au niveau nucléaire, une fraction protéique de protoplastes fortement enrichie en protéines nucléaires a été obtenue (pour plus de précisions sur la technique d'isolement des noyaux de protoplastes, se reporter au chapitre « Matériel et Méthodes »). La présence de la protéine HaWLIM-1

parmi les protéines nucléaires de protoplastes a ensuite été recherchée par immunodétection à l'aide des anticorps anti-HaWLIM-1.

La figure 16 indique que le polypeptide majoritairement présent dans le noyau des protoplastes de tournesol est le polypeptide de 52 kDa. Sur chacune des pistes - piste « protéines totales » et piste « protéines nucléaires » - ont été déposées des quantités identiques en protéines (30 µg). Proportionnellement, il y a donc moins de protéines nucléaires sur la piste « protéines totales » que sur la piste « protéines nucléaires » (dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, les protéines nucléaires représentent environ un tiers des protéines totales). Cependant, l'intensité de la bande correspondant au polypeptide de 52 kDa est semblable pour les deux pistes. Cette observation suggère que le polypeptide de 52 kDa n'est pas exclusivement localisé dans le noyau.

Ces expériences d'immunodétection de la protéine HaWLIM-1 dans des extraits nucléaires nous ont permis de déterminer que le marquage observé dans le noyau des protoplastes correspond principalement au polypeptide de 52 kDa. Ce polypeptide de 52 kDa n'est pas uniquement localisé au niveau nucléaire, mais est également présent dans le cytoplasme des protoplastes. La localisation du polypeptide de 78 kDa semble par contre limitée au cytoplasme.

### **III. LES PROTEINES HaWLIM-1 CYTOPLASMIQUES : ASSOCIATION AVEC DES COMPOSANTES DU CYTOSQUELETTE CORTICAL ?**

Le marquage cortical se présente sous forme de petits points distincts, alignés les uns par rapport aux autres, et organisés le long d'un réseau cortical dense (Fig. 14-A). Le marquage cortical révélé par le sérum pré-immun est également constitué de points isolés, mais ceux-ci sont peu nombreux et répartis aléatoirement au niveau du cortex des protoplastes (Fig. 14-B). On peut noter que, lorsque la concentration en anticorps anti-HaWLIM-1 utilisée est très élevée (concentrations supérieures à 1 : 7000<sup>e</sup>), la fluorescence respective de chaque point est si intense que le marquage ponctiforme disparaît pour faire place à un marquage continu.

Le marquage cortical spécifique de HaWLIM-1 semble suivre un réseau intracellulaire dense. Ce réseau est particulièrement visible lorsque la concentration en anticorps est élevée. La forme de ce marquage donne à penser que la protéine HaWLIM-1 pourrait être localisée sur le réseau de microtubules et/ou de microfilaments d'actine, constituant le cytosquelette cortical. Afin de vérifier cette hypothèse, la protéine HaWLIM-1 et les différentes composantes du cytosquelette ont été marqués simultanément dans les protoplastes.

## **A. Evaluation de la colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec le cytosquelette cortical.**

Le double marquage s'effectue en marquant les protoplastes à l'aide d'anticorps anti-HaWLIM-1 et d'anticorps anti-tubuline d'une part, ou à l'aide d'anticorps anti-HaWLIM-1 et d'anticorps anti-actine d'autre part. Les deux catégories d'anticorps sont appliquées simultanément. Les marquages obtenus par les deux anticorps sont différenciés grâce à l'utilisation de deux fluorochromes de couleur contrastée : la fluoresceine de couleur verte pour le marquage des protéines LIM, et le Texas Red de couleur rouge pour le marquage de la tubuline et de l'actine. Les protoplastes sont ensuite observés en microscopie à épifluorescence, puis la fréquence de colocalisation des deux composants est quantifiée (pour plus de précisions sur la technique de quantification de la colocalisation, se reporter au chapitre « Matériels et Méthodes »).

### **A1. Double-marquage HaWLIM-1 / microfilaments d'actine.**

L'analyse des images obtenues révèle que les protéines HaWLIM-1 corticales présentent  $30.1 \pm 4.2$  % (moyenne  $\pm$  e. s.) de colocalisation avec les microfilaments d'actine corticaux. La localisation de ces protéines le long du réseau d'actine est très partielle et semble limitée à certaines zones des protoplastes (Fig. 17).

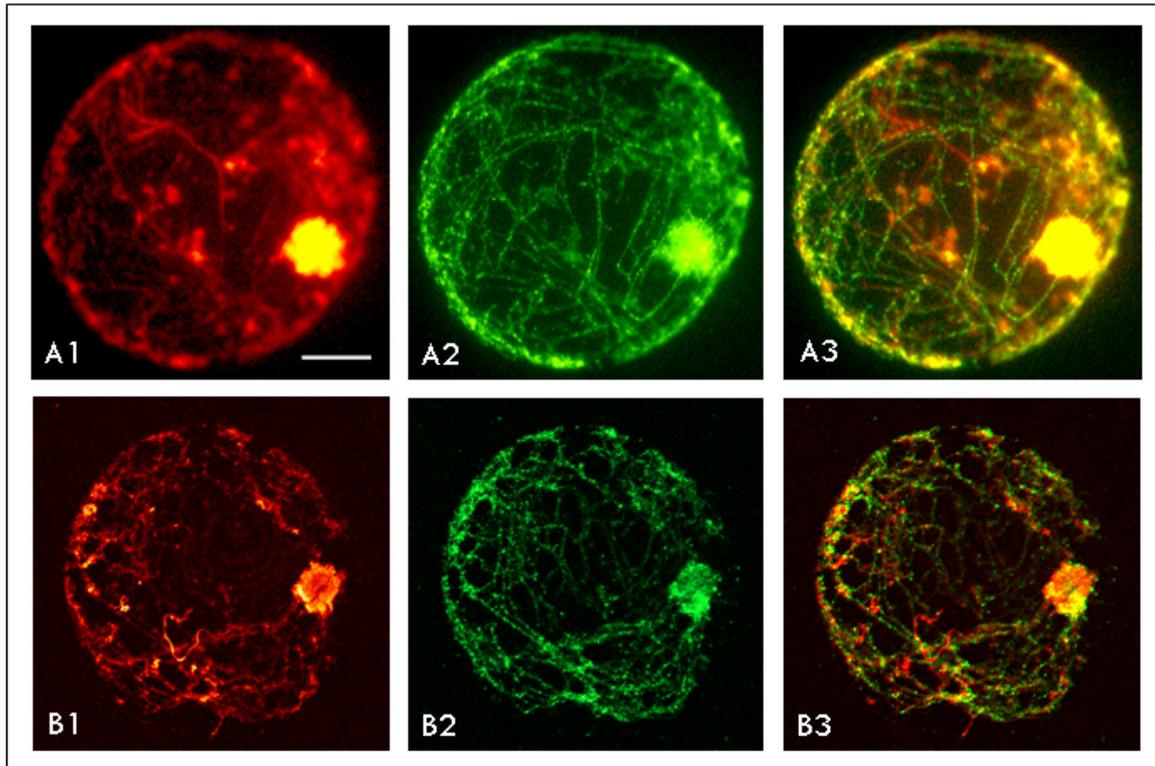
### **A2. Double-marquage HaWLIM-1 / microtubules.**

La colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec les microtubules est par contre beaucoup plus nette. La protéine HaWLIM-1 forme en effet des clusters répartis régulièrement le long de l'ensemble du réseau de microtubules corticaux (Fig. 18). L'observation de sections optiques des protoplastes réalisées en microscopie confocale confirme cette observation (Fig. 18-C et 18-D). De plus, l'analyse des images obtenues indique que les protéines LIM corticales présentent  $74.3 \pm 1.4$  % de colocalisation avec les microtubules corticaux.

Cette expérience de double localisation révèle en outre que le marquage péri-nucléaire observé correspond à la cage de microtubules entourant le noyau des protoplastes. Les protéines LIM ne sont donc pas exclusivement localisées au niveau des microtubules corticaux, mais également au niveau des microtubules péri-nucléaires.

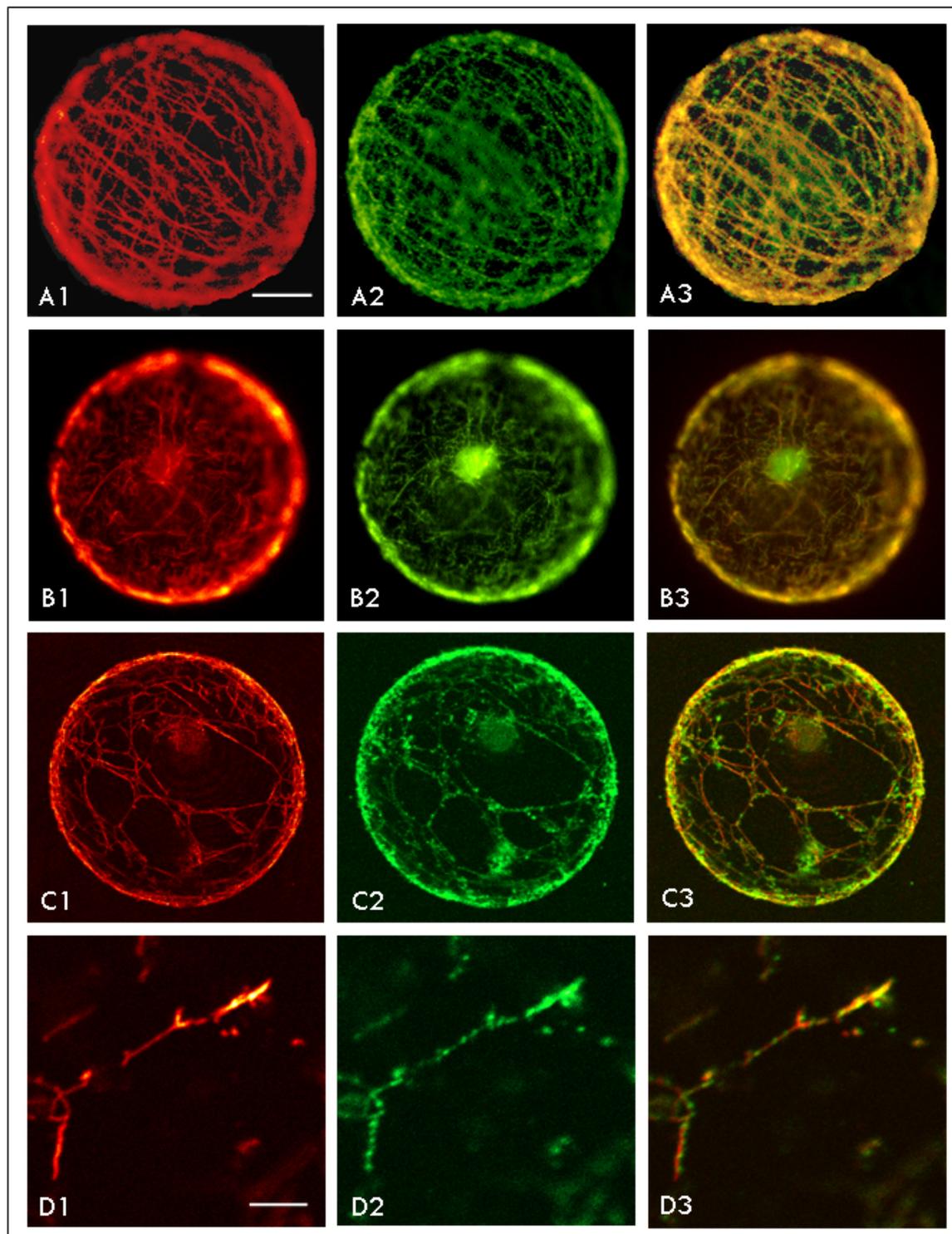
Ces expériences de double-marquage nous ont permis de déterminer que la protéine HaWLIM-1 est co-localisée avec deux des composantes du cytosquelette : les microtubules et les microfilaments d'actine. La colocalisation avec les microtubules est évidente, celle avec l'actine est au contraire restreinte à certaines parties du réseau.

Il est possible que la colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec les microfilaments d'actine soit exclusivement limitée aux zones du protoplaste où les microtubules et les microfilaments d'actine sont eux-même colocalisés, et que la protéine HaWLIM-1 ne soit finalement localisée que sur les microtubules. Il s'avère donc nécessaire de récolter plus de données afin de lever cette ambiguïté. Le suivi du devenir des protéines LIM lors de changements intervenant dans la dynamique du cytosquelette peut apporter des indications supplémentaires sur les interactions existant entre les protéines LIM et certaines composantes du cytosquelette.



**Figure 17.** Double-marquage microfilaments d'actine / protéine HaWVIM-1.

Des protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolés sont marqués simultanément à l'aide d'anticorps anti-actine et d'anticorps anti-HaWVIM-1. **A.** Image d'un protoplaste en microscopie conventionnelle. **B.** Section confocale d'un protoplaste. (A1, B1) marquage de l'actine révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au Texas Red; (A2, B2) marquage de la protéine HaWVIM-1 révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au FITC; (A3, B3) superposition des images actine et HaWVIM-1, les zones apparaissant en jaune sont révélatrices d'une co-localisation entre les microfilaments d'actine et la protéine HaWVIM-1. (Barre = 10  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 18.** Double-marquage microtubules / protéine HaWVLM-1.

Des protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolés sont marqués simultanément à l'aide d'anticorps anti-bêta-tuline et d'anticorps anti-HaWVLM-1. **A.** et **B.** Image d'un protoplaste en microscopie conventionnelle. **C.** Section confocale d'un protoplaste. (Barre = 10  $\mu$ M) **D.** Section confocale d'un protoplaste, zoom sur un microtubule (Barre = 2  $\mu$ M). (A1, B1, C1, D1) marquage des microtubules révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au Texas Red (A2, B2, C2, D2) marquage de la protéine HaWVLM-1 révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au FITC (A3, B3, C3, D3) superposition des images microtubules et HaWVLM-1, les zones apparaissant en jaune sont révélatrices d'une co-localisation entre les microtubules et la protéine HaWVLM-1.

## **B. Devenir de la protéine HaWLIM-1 lorsque l'état du cytosquelette est modifié.**

Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin de dépolymériser le cytosquelette de cellules végétales. Certains auteurs ont par exemple démontré la possibilité de déstructurer les microtubules de protoplastes de tournesol grâce à un traitement sous pression hydrostatique élevée (Barthou *et al.*, 1997 ; Cleary *et Hardham*, 1990). Un traitement à basses températures permet également de dépolymériser les microtubules. Cependant, la technique la plus simple à mettre en œuvre et la plus généralement utilisée est l'approche pharmacologique.

### **B1. Dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline.**

Certaines drogues, comme la colchicine, le nocodazole, la vinblastine, l'amiprofos-méthyl ou les herbicides de type dinitro-aniline, comme l'oryzaline ou la trifluoraline, sont connues pour avoir la propriété de dépolymériser complètement les microtubules. Il est donc possible de les utiliser pour déstructurer les microtubules des protoplastes de tournesol.

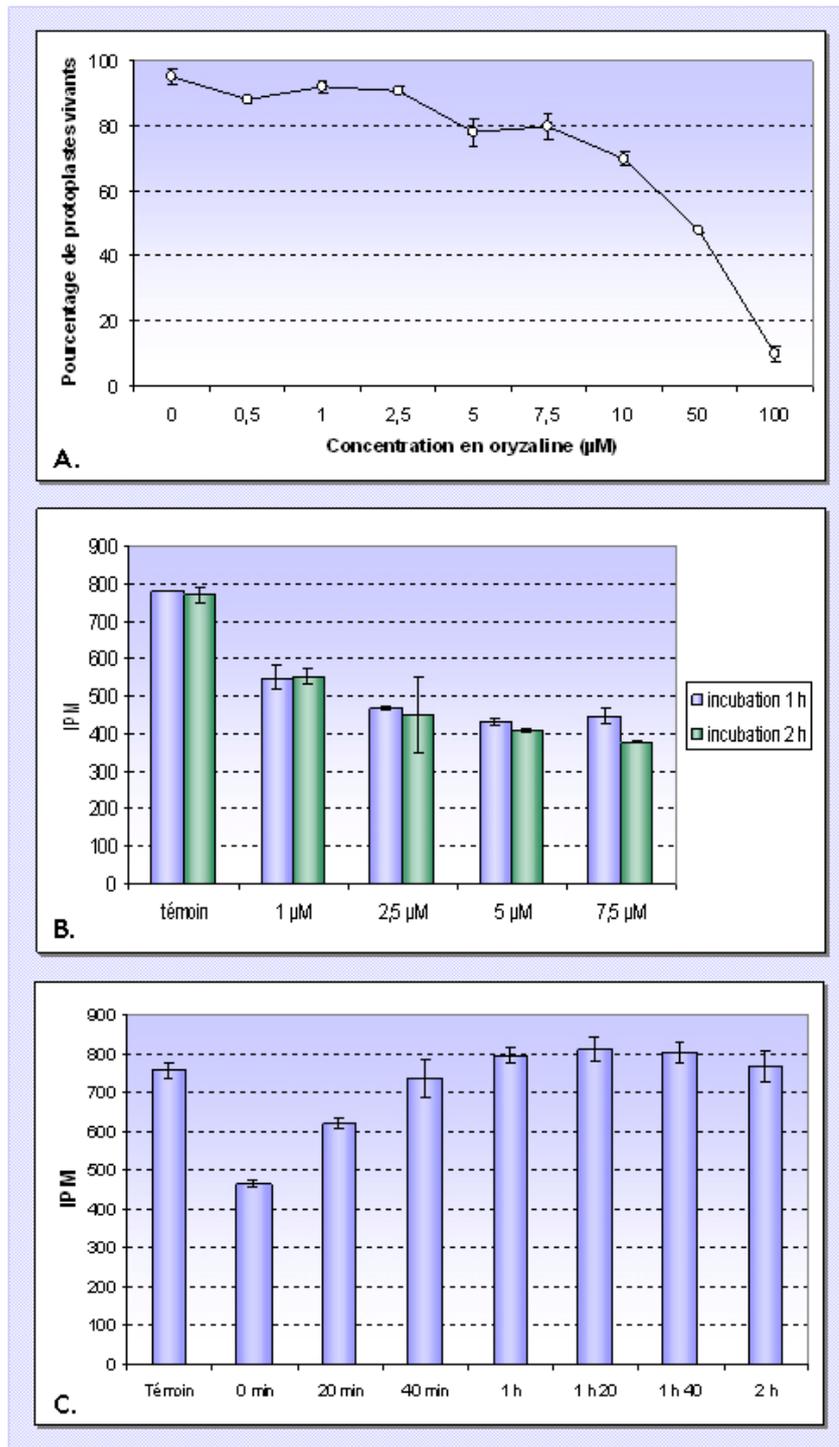
L'oryzaline (Cleary *et Hardham*, 1990), généralement utilisée chez les végétaux en tant qu'herbicide sélectif de pré-émergence, a une action limitée aux cellules végétales. En effet, cet herbicide se fixe sur les tubulines de plantes, mais pas sur les tubulines animales. De plus, l'effet de l'oryzaline est réversible. En outre, ce composé a déjà été utilisé avec succès sur des protoplastes (Mazars *et al.*, 1997). Pour ces différentes raisons, nous avons choisi d'utiliser l'oryzaline de préférence aux autres agents chimiques précédemment cités. Avant de pouvoir employer cette drogue dans nos expériences, il a été nécessaire de définir au préalable un protocole adéquat.

#### **B1.1. Mise au point du protocole de dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline.**

##### **► Effet de l'oryzaline sur la viabilité des protoplastes.**

Afin de contrôler la viabilité des protoplastes en présence d'oryzaline, et de déterminer la dose létale de cette drogue sur les protoplastes, des concentrations croissantes en oryzaline sont ajoutées au milieu de culture de protoplastes fraîchement isolés. Les protoplastes sont incubés dans ce milieu pendant 30 minutes, puis leur viabilité est déterminée grâce à un marquage au FDA.

On constate alors (Fig. 19-A) que la viabilité des protoplastes est peu altérée pour des concentrations en oryzaline inférieures à 7.5  $\mu\text{M}$ . Par contre, pour des concentrations supérieures à 7.5  $\mu\text{M}$ , la viabilité des protoplastes diminue rapidement jusqu'à pratiquement s'annuler dès la concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Il est donc nécessaire d'utiliser des concentrations en oryzaline inférieures à 10  $\mu\text{M}$  pour limiter la toxicité de ce composé.



**Figure 19.** Mise au point d'un protocole de dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline.

**A.** Viabilité des protoplastes en présence d'oryzaline : les protoplastes fraîchement isolés sont remis en suspension dans du milieu de culture liquide TLD, additionné d'oryzaline à différentes concentrations; après 30 minutes d'incubation, la viabilité des protoplastes est évaluée grâce à un marquage au FDA. **B.** Essai de différentes concentrations en oryzaline et de différentes durées d'incubation. **C.** Cinétique de restructuration des microtubules après un traitement par l'oryzaline. (IPM) Indice de Polymérisation des Microtubules.

- Détermination de la concentration efficace en oryzaline pour dépolymériser les microtubules.

L'oryzaline est ajoutée au milieu de culture des protoplastes à différentes concentrations, allant de 0 à 7.5  $\mu\text{M}$ , afin de ne pas affecter la viabilité des protoplastes. Après incubation avec ce composé, les protoplastes sont fixés. Un marquage immunocytologique des microtubules est alors réalisé, puis l'indice de polymérisation des microtubules (IPM) est déterminé (pour plus de précisions sur le calcul de l'IPM, se reporter au chapitre « Matériels et Méthodes »).

A l'état natif, le réseau microtubulaire des protoplastes fraîchement isolés est dense, composé de microtubules longs, et présente un niveau d'organisation important. Or, l'oryzaline a un effet-dose particulièrement marqué sur l'aspect et l'organisation de ces microtubules (Fig. 19-B). Ainsi, pour des concentrations élevées en oryzaline, on observe une diminution importante et significative de l'IPM. L'effet de l'oryzaline s'exprime totalement dès la concentration de 5  $\mu\text{M}$ . C'est donc cette concentration, compatible avec une bonne viabilité des protoplastes, qui sera retenue pour la suite des expériences.

- Détermination de la durée d'incubation optimale des protoplastes avec l'oryzaline.

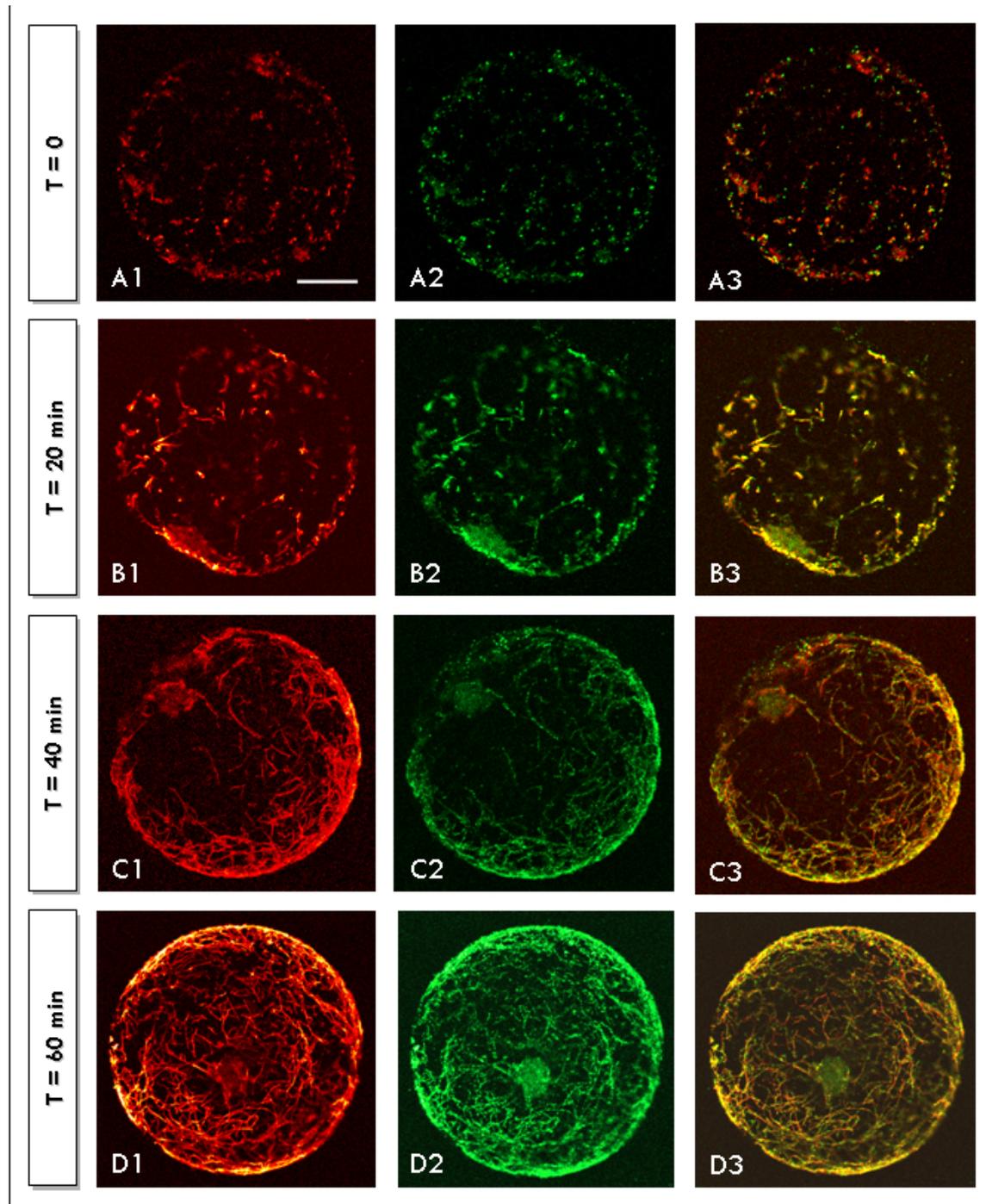
Les protoplastes sont maintenus en présence d'oryzaline pendant 1 ou 2 heures, puis l'IPM est évalué. L'effet de l'oryzaline est légèrement plus marqué dans le cas d'une incubation de deux heures, mais la dépolymérisation des microtubules a pratiquement atteint son maximum après seulement une heure de traitement (Fig. 19-B). Afin d'éviter au maximum un éventuel effet toxique de l'oryzaline sur les protoplastes, nous avons choisi de laisser les protoplastes en présence de l'oryzaline pendant une heure.

- Réversibilité du traitement.

Pour vérifier que la dépolymérisation des microtubules des protoplastes est bien réversible, les protoplastes sont traités par l'oryzaline à 5  $\mu\text{M}$  pendant une heure, puis l'oryzaline est éliminée du milieu de culture. Les protoplastes sont ensuite maintenus dans ce nouveau milieu de culture, afin de permettre l'éventuelle repolymérisation de leurs microtubules. Des protoplastes sont prélevés régulièrement, fixés, puis marqués à l'aide d'anticorps anti-tubuline, afin de suivre la repolymérisation des microtubules au cours du temps.

Les résultats présentés sur la figure (Fig. 19-C) montrent qu'il y a bien une repolymérisation des microtubules après l'élimination de l'oryzaline du milieu de culture. On observe en effet au cours du temps une augmentation de l'IPM. Les microtubules retrouvent leur état initial une heure après la fin du traitement.

Ces expériences nous ont donc permis de mettre en évidence une action particulièrement efficace de l'oryzaline sur les microtubules des protoplastes de tournesol. Cette drogue est en effet capable de dépolymériser efficacement les microtubules, et ceci de façon relativement rapide. L'action de l'oryzaline est en outre réversible. Nous pouvons donc envisager l'utilisation de l'oryzaline pour étudier le devenir de la protéine HaW<sup>L</sup>IM-1 lorsque les microtubules des protoplastes sont dépolymérisés, puis lors de la restructuration de ces mêmes microtubules.



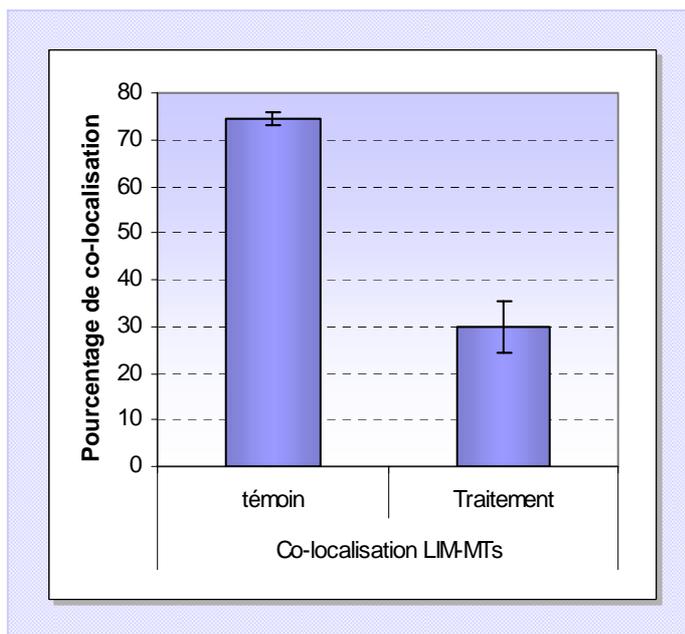
**Figure 20.** Immunocytochemical localization of the protein HaWLIM-1 in sunflower hypocotyl protoplasts after microtubule depolymerization by oryzalin.

Les protoplastes fraîchement isolés sont incubés durant une heure en présence de  $5 \mu\text{M}$  d'oryzaline, puis fixés à intervalles réguliers après la fin du traitement. Les protoplastes sont ensuite marqués simultanément à l'aide d'anticorps anti-HaWLIM-1 et d'anticorps anti-béta-tubuline. Des sections confocales des protoplastes sont ensuite réalisées. **A.** Fixation juste après la fin du traitement; **B.** Fixation 20 min après la fin du traitement; **C.** Fixation 40 min après la fin du traitement; **D.** Fixation 60 min après la fin du traitement. (A1, B1, C1, D1) Marquage des microtubules révélé grâce à un anticorps secondaire conjugué au Texas Red (A2, B2, C2, D2) Marquage de la protéine HaWLIM-1 révélé grâce à un anticorps secondaire conjugué au FITC (A3, B3, C3, D3) Superposition des images microtubules et HaWLIM-1, les zones apparaissant en jaune sont révélatrices d'une co-localisation entre la protéine HaWLIM-1 et les microtubules. (Barre =  $10 \mu\text{M}$ ).

### B1.2. La dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline modifie l'organisation des protéines LIM corticales.

Les protoplastes sont incubés durant une heure en présence d'oryzaline à 5  $\mu\text{M}$ , puis fixés à intervalles réguliers après la fin du traitement afin de pouvoir suivre la repolymérisation des microtubules, ainsi que le devenir des protéines LIM au cours des variations dans la dynamique du réseau microtubulaire. Enfin, un double marquage HaWLIM-1 / microtubules est réalisé sur les protoplastes fixés.

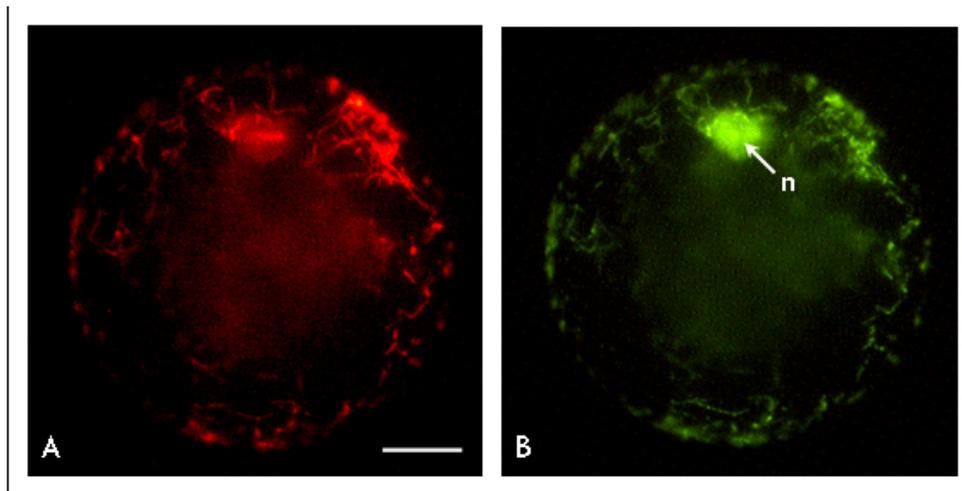
Lorsque les microtubules sont entièrement dépolymérisés (Fig. 20), la densité en protéines LIM dans les protoplastes devient très faible, et la fréquence de colocalisation des protéines LIM et des microtubules diminue jusqu'à  $29.8 \pm 5.4 \%$ , indiquant une perturbation forte de l'organisation des protéines LIM corticales (Fig. 21). Au fur et à mesure que les microtubules se repolymérisent, les protéines LIM retrouvent leur localisation le long du réseau cortical microtubulaire. La dynamique des protéines LIM semble être parfaitement coordonnée avec celle des microtubules. Par ailleurs, on peut noter que la dépolymérisation des microtubules ne modifie en rien l'aspect du marquage intranucléaire de la protéine HaWLIM-1 au niveau du nucléole (Fig. 22), ce qui indique que ce marquage est totalement indépendant du marquage cortical de la protéine HaWLIM-1.



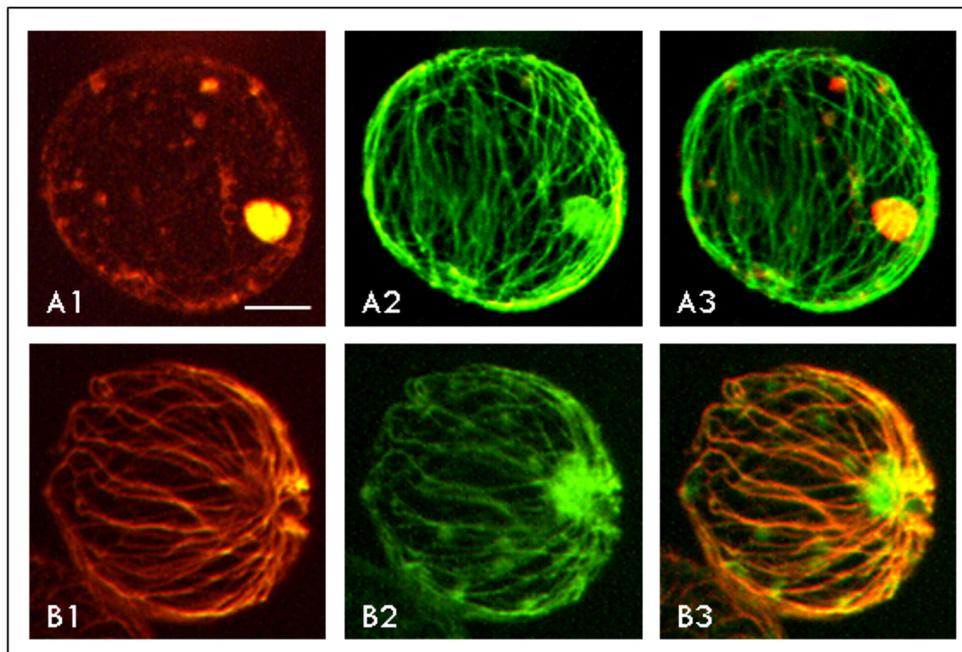
**Figure 21.** Quantification de la fréquence de co-localisation entre la protéine HaWLIM-1 et les microtubules avec et sans le traitement oryzaline.

### B2. Dépolymérisation des microfilaments d'actine par la latrunculine B.

L'approche pharmacologique est très couramment utilisée pour étudier l'organisation, la dynamique et les fonctions des microfilaments d'actine. Jusqu'à très récemment, il existait peu d'agents chimiques connus, autres que les cytochalasines, capables de se fixer à l'actine et de modifier sa dynamique. Désormais, plusieurs drogues possédant des propriétés similaires ont été identifiées, incluant les latrunculines, les jaspamides, la swinholide A, la misakinolide A, les halichondramides, et la pectenotoxine II (Spector et al., 1999).



**Figure 22.** Immunocytochemical localisation de la protéine HaWLLIM-1 dans les noyaux de protoplastes d'hypocotyles de tournesol après dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline. Les protoplastes fraîchement isolés sont incubés durant une heure en présence de 5  $\mu\text{M}$  d'oryzaline, puis fixés dès la fin du traitement. Ils sont ensuite marqués simultanément à l'aide d'anticorps anti-HaWLLIM-1 et d'anticorps anti-béta-tubuline. **A.** Le marquage des microtubules est révélé par l'utilisation d'anticorps secondaires conjugués au Texas Red; **B.** Le marquage de la protéine HaWLLIM-1 est révélé par l'utilisation d'anticorps secondaires conjugués au FITC. (n) nucléole. (Barre = 10  $\mu\text{M}$ ).

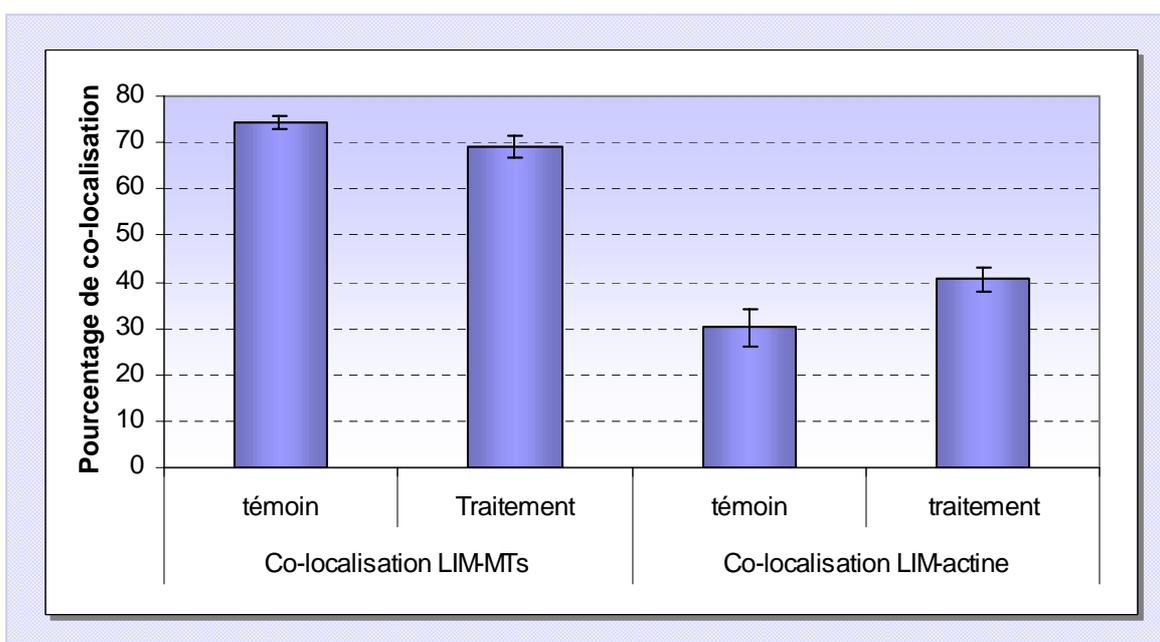


**Figure 23.** Immunocytochemical localisation de la protéine HaWLLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol après dépolymérisation des microfilaments d'actine par la latrunculine. Les protoplastes fraîchement isolés sont incubés durant une heure en présence de 0.2  $\mu\text{M}$  de latrunculine, puis fixés à la fin du traitement. Un double-marquage des protoplastes est ensuite réalisé. **A.** Double-marquage HaWLLIM-1 / actine; **B.** Double-marquage HaWLLIM-1 / microtubules. (A1, B1) Le marquage de l'actine ou des microtubules est révélé grâce à un anticorps secondaire conjugué au Texas Red (A2, B2) Le marquage de la protéine HaWLLIM-1 est révélé grâce à un anticorps secondaire conjugué au FITC (A3, B3) Superposition des images actine ou microtubules et HaWLLIM-1, les zones apparaissant en jaune-orangé sont révélatrices d'une co-localisation entre les deux composants. (Barre = 10  $\mu\text{M}$ ).

Un protocole de dépolymérisation des microfilaments d'actine sur les protoplastes de tournesol étant disponible (*H. Barthou, communication personnelle*), nous avons donc retenu cette drogue pour réaliser cette étude.

Après une incubation de quatre heures avec la latrunculine B, les protoplastes sont fixés, puis un double marquage de la protéine HaWLIM-1 et des microtubules d'une part, et de la protéine HaWLIM-1 et des microfilaments d'actine d'autre part, est réalisé.

Contrairement à ce qui est observé lors de la dépolymérisation des microtubules, la déstructuration du réseau d'actine ne semble pas engendrer de modifications au niveau de la localisation de la protéine HaWLIM-1 (Fig. 23). Le marquage HaWLIM-1 est dense, et la protéine HaWLIM-1 reste majoritairement localisée le long du réseau microtubulaire, qui n'est pas, ou peu, perturbé par la disparition des microfilaments d'actine. En outre, les fréquences de colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec le cytosquelette, microtubules ou microfilaments d'actine, restent pratiquement inchangées (Fig. 24) (les différences pouvant être observées sur le graphique entre les valeurs correspondant au témoin et au traitement ne sont statistiquement pas significatives).



**Figure 24.** Quantification de la fréquence de co-localisation entre la protéine HaWLIM-1 et les microfilaments d'actine, et entre la protéine HaWLIM-1 et les microtubules, avec et sans le traitement latrunculine.

Ces expériences de dépolymérisation du cytosquelette nous ont permis de déterminer que la localisation de la protéine HaWLIM-1 dépend de l'organisation des microtubules, et pratiquement pas de l'organisation des microfilaments d'actine. Cette observation est en faveur de l'hypothèse selon laquelle la protéine HaWLIM-1 serait étroitement associée aux microtubules.

### C. Les anticorps anti-HaWLIM-1 interagissent-ils avec les microtubules ?

Les diverses expériences d'immunocytolocalisation présentées précédemment révèlent que le marquage HaWLIM-1 est fortement localisé au niveau des microtubules. De plus, on sait que les anticorps anti-HaWLIM-1 reconnaissent en western blot un polypeptide de masse moléculaire voisine de 50 kDa, qui est également la masse moléculaire des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces deux observations, prises conjointement, conduisent à se demander si les anticorps utilisés peuvent interagir directement avec les microtubules, et provoquer de ce fait des artefacts au niveau du marquage HaWLIM-1. Pour répondre à cette question, la spécificité de reconnaissance de la protéine HaWLIM-1 a été évaluée de différentes façons.

#### C1. Expériences de compétition.

Ces expériences de compétitions consistent à ajouter des anticorps anti-tubulines non marqués sur les protoplastes, avant l'application des anticorps anti-HaWLIM-1, afin de masquer les sites potentiels de fixation des anticorps anti-HaWLIM-1 sur les microtubules. Si les anticorps anti-HaWLIM-1 reconnaissent effectivement les tubulines, le marquage obtenu à la suite de cette expérience devrait être modifié. Dans le cas contraire, il restera inchangé. Ces expériences de compétition ont été réalisées à la fois en immunoblot et en immunocytologie.

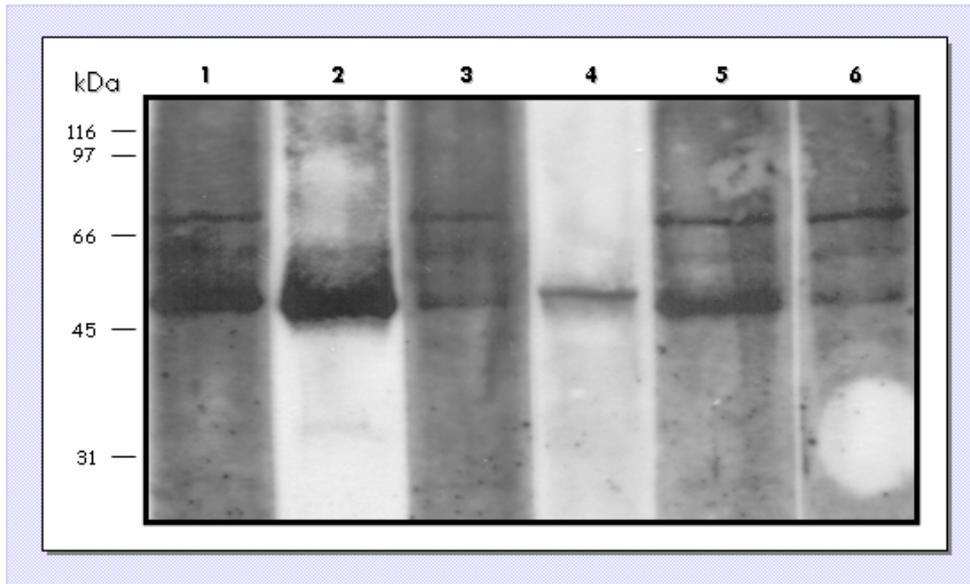
##### ► Expérience de compétition en immunoblot.

Les protéines totales de protoplastes sont séparées sur gel d'acrylamide, transférées sur membrane de nitrocellulose, puis pré-incubées avec des anticorps anti- $\alpha$ -tubuline et/ou des anticorps anti- $\beta$ -tubuline avant l'application des anticorps anti-HaWLIM-1. Les deux catégories d'anticorps sont appliquées à la même concentration, à savoir au 1 : 1000<sup>e</sup>. Les résultats présentés sur la figure 25 indiquent que le profil des protéines reconnues par les anticorps anti-HaWLIM-1 n'est pas modifié par une pré-incubation avec des anticorps anti-tubulines. En particulier, le polypeptide de 52 kDa est toujours révélé par les anticorps anti-HaWLIM-1.

##### ► Expériences de compétition en immunocytologie.

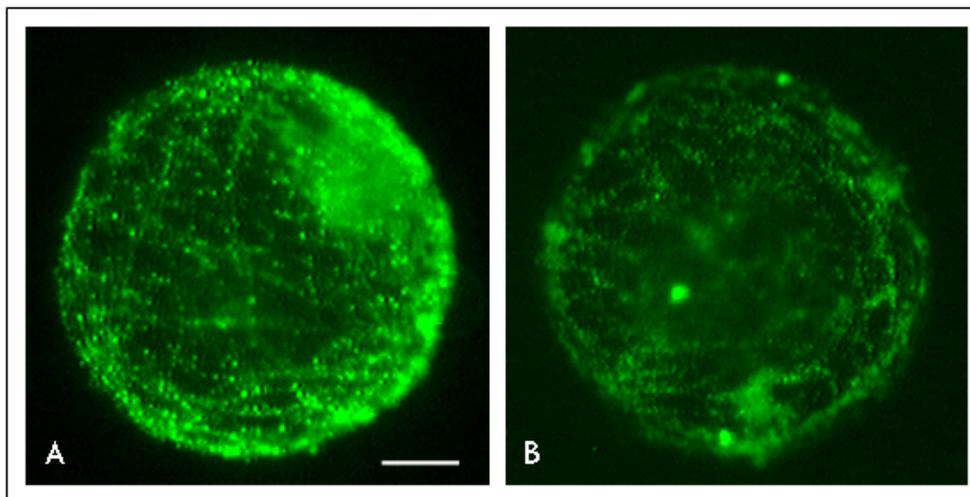
Les anticorps anti-HaWLIM-1 sont appliqués sur des protoplastes fixés, dont les sites de reconnaissance sur les microtubules ont été au préalable saturés à l'aide d'un mélange d'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline et anti- $\beta$ -tubuline. Les deux types d'anticorps sont appliqués à une concentration de 1 : 7000<sup>e</sup>.

Le marquage observé après la pré-incubation des protoplastes avec les anticorps anti-tubulines est pratiquement identique au marquage observé pour le témoin positif, où les anticorps anti-HaWLIM-1 sont appliqués seuls sur les protoplastes (Fig. 26). On peut remarquer une légère diminution de l'intensité du marquage, cependant la forme du marquage (répartition de la protéine HaWLIM-1 le long du réseau microtubulaire) n'est pas modifiée.



**Figure 25.** Immunodétection de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol après saturation des sites de fixation sur les microtubules à l'aide d'anticorps anti-tubulines.

Les protéines totales de protoplastes fraîchement isolés sont extraites, séparées sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, puis mises en présence des anticorps. **Piste 1** : Anticorps anti-HaWLIM-1 (1 : 10 000e); **Piste 2** : anticorps anti-alpha-tubuline (1 : 100 000e); **Piste 3** : Anticorps anti-HaWLIM-1 (1 : 1000e) appliqués après saturation des sites de fixation sur les microtubules par des anticorps anti-alpha tubuline (1 : 1000e); **Piste 4** : Anticorps anti-béta-tubuline (1 : 1000e); **Piste 5** : Anticorps anti-HaWLIM-1 (1 : 1000e) appliqués après saturation des sites de fixation sur les microtubules par des anticorps anti-béta-tubuline (1 : 1000e). **Piste 6** : Anticorps anti-HaWLIM-1 (1 : 1000e) appliqués après saturation des sites de fixation sur les microtubules par des anticorps anti-alpha et béta-tubuline (1 : 1000e).



**Figure 26.** Immunocyto-localisation de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol après saturation des sites de fixation sur les microtubules à l'aide d'anticorps anti-tubuline.

Marquage de protoplastes fraîchement isolés. **A.** Anticorps anti-HaWLIM-1 (1:7000e); **B.** Anticorps anti-HaWLIM-1 (1:7000e) appliqués après saturation des sites de fixation sur les microtubules par des anticorps anti-alpha et béta-tubuline (1 : 7000e). (Barre = 10  $\mu$ m).

Cette variation dans l'intensité du marquage peut s'expliquer par un encombrement stérique au niveau des microtubules, qui peut éventuellement gêner la fixation des anticorps anti-HaWLIM-1 sur la protéine HaWLIM-1, dont la localisation est proche des microtubules.

En conclusion, lorsque des anticorps anti-tubulines non marqués sont ajoutés sur les protoplastes avant la réalisation du marquage, le signal obtenu avec les anticorps anti-HaWLIM-1 n'est pas ou peu modifié, ce qui suggère que les anticorps anti-HaWLIM-1 n'interagissent pas directement avec les tubulines.

## **C2. Immunodétection de tubulines purifiées à l'aide des anticorps anti-HaWLIM-1.**

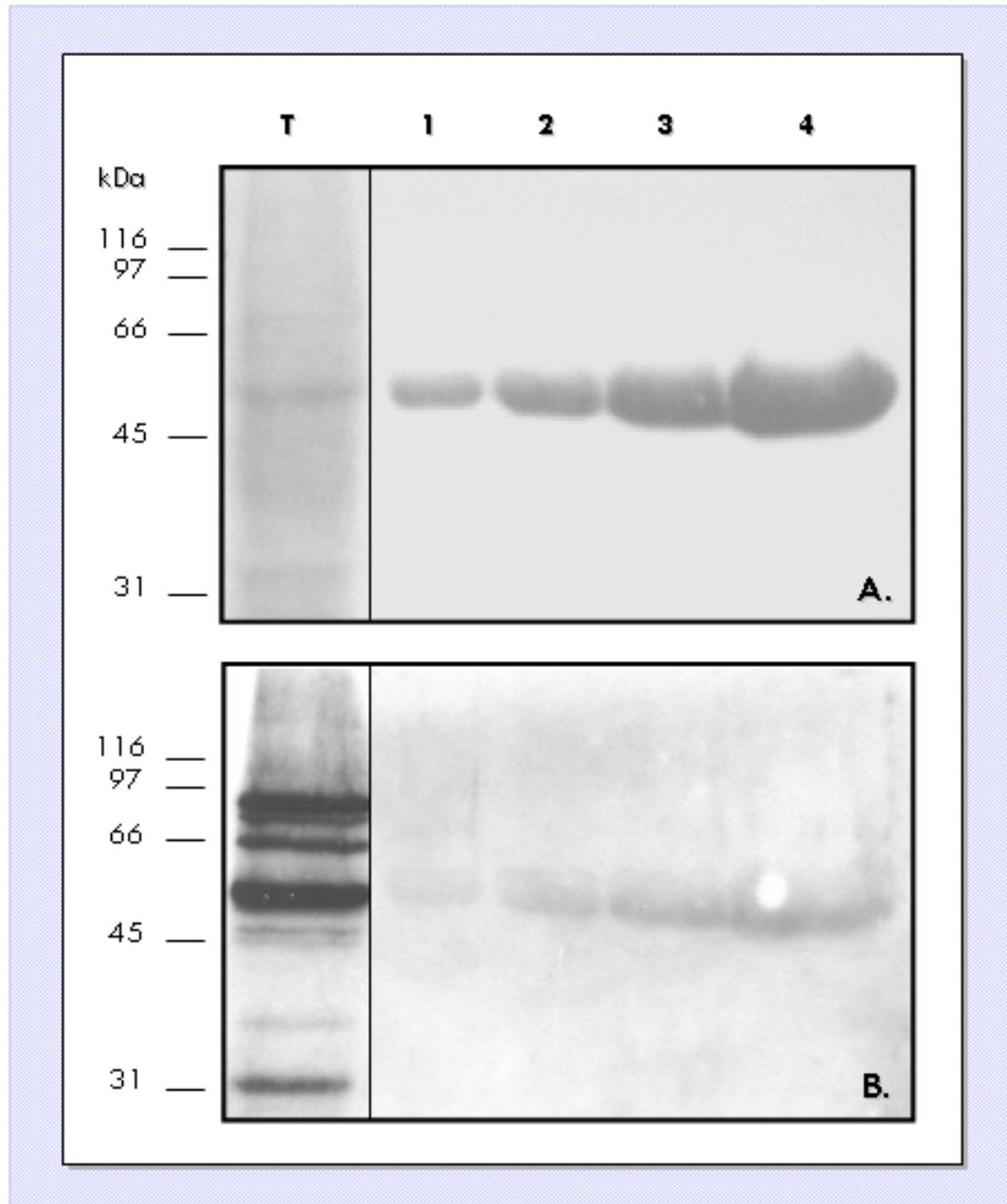
Un mélange de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  purifiées a été transféré sur membrane de nitrocellulose après séparation électrophorétique (Fig. 27-A). Les anticorps anti-HaWLIM-1 ont ensuite été appliqués sur ces protéines (Fig. 27-B).

La figure 27 indique que les anticorps anti-HaWLIM-1 ne reconnaissent pas ce mélange de tubulines, et ceci même lorsqu'ils sont appliqués sur de très grandes quantités de tubulines purifiées. Les légères traces visibles sur le film correspondent à un marquage non spécifique de faible intensité, qui peut difficilement être à l'origine du fort marquage observé au alentours de 50 kDa. Ces observations indiquent donc que le polypeptide de 52 kDa reconnu par les anticorps anti-HaWLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol ne correspond ni à l' $\alpha$  tubuline, ni à la  $\beta$  tubuline. Elles permettent en outre de confirmer les résultats obtenus à la suite des expériences de compétitions.

## **III. DISCUSSION.**

Les études présentées dans le Chapitre 1 de ce mémoire avaient, entre autres, comme objectif de déterminer sous quelle forme la protéine HaWLIM-1 se présentait dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Les résultats obtenus semblent indiquer que cette protéine n'est pas présente sous forme de monomère dans la cellule, et qu'elle est étroitement impliquée dans des interactions moléculaires de type protéines-protéines. L'analyse de la localisation intracellulaire de la protéine HaWLIM-1 a alors été menée afin d'avoir plus de précisions sur la nature et la fonction des complexes protéiques comportant la protéine HaWLIM-1.

Ces études ont révélé que la protéine HaWLIM-1 pouvait être détectée dans deux compartiments intracellulaires distincts : le noyau et le cytoplasme. Le marquage nucléaire correspond au polypeptide de 52 kDa, alors que le marquage observé au niveau cytoplasmique peut correspondre à la fois au polypeptide de 52 kDa et au polypeptide de 78 kDa. La présence de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau est principalement limitée au nucléole. Le marquage cortical spécifique de HaWLIM-1 semble suivre un réseau dense, et est colocalisée sur les microtubules et/ou les microfilaments d'actine, constituant le cytosquelette cortical.



**Figure 27.** Application des anticorps anti-HaWVLM-1 sur un échantillon de tubulines alpha et béta purifiées.

Les anticorps anti-HaWVLM-1 sont appliqués à la concentration de 1 : 10 000e sur des protéines totales de protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolées (T), ou sur un mélange de tubulines alpha et béta purifiées (1,2,3,4). Les quantités en protéines déposées sur le gel sont de (T) 30 µg, (1) 2.5 µg, (2) 5 µg, (3) 10 µg, (4) 20 µg. **A.** Coloration des protéines au rouge Ponceau après transfert sur membrane de nitrocellulose; **B.** Révélation ECL après application des anticorps anti-HaWVLM-1.

La colocalisation avec les microtubules est évidente, celle avec l'actine est au contraire restreinte à certaines parties du réseau, qui pourraient correspondre aux zones du protoplaste où les microtubules et les microfilaments d'actine sont eux-même co-localisés. Des expériences de dépolymérisation du cytosquelette ont permis de déterminer que la répartition de la protéine HaWLIM-1 dépend de l'organisation et du degré de polymérisation des microtubules, et pas, ou peu, de l'organisation des microfilaments d'actine. Cette observation est en faveur de l'hypothèse selon laquelle la protéine HaWLIM-1 serait étroitement associée aux microtubules. On peut noter également que la dépolymérisation des microtubules ne modifie en rien l'aspect du marquage intranucléaire de la protéine HaWLIM-1 au niveau du nucléole, ce qui indique que ce marquage est totalement indépendant du marquage cortical de la protéine HaWLIM-1.

#### **A. La protéine HaWLIM-1 présente une double localisation intracellulaire dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol.**

Les anticorps polyclonaux spécifiques de la protéine HaWLIM-1, couplés à une sonde fluorescente, marquent de façon spécifique des structures dans deux compartiments cellulaires distincts du protoplaste : le noyau et le cytoplasme. En particulier, il a été montré que le polypeptide de 52 kDa pouvait être détecté à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme.

Cette double localisation de la protéine HaWLIM-1 a déjà pu être observée par Mundel et collaborateurs (Mundel et al., 2000) dans d'autres tissus de tournesol, en particulier dans la tige, les feuilles et les ovaires. Dans les cellules animales, une double localisation intracellulaire de ce type a également été décrite pour certains groupes de protéines LIM : les protéines CRP, dont les protéines LIM végétales sont très proches structuralement, et les protéines LIM de la famille des zyxines. Les protéines CRP possèdent la particularité de changer de localisation en fonction du développement cellulaire. Ainsi, dans les fibroblastes indifférenciés, la protéine CRP-3 / MLP est détectée exclusivement dans le noyau, tandis que dans les myotubes différenciés, elle migre pour partie du noyau vers le cytoplasme (Arber et al., 1994). On peut également citer le cas de la protéine SLIMMER, une protéine LIM musculaire dont la localisation intracellulaire est également dépendante du stade de développement de la cellule. Tandis que les protéines LIM CRP (incluant les protéines LIM végétales) présentent une phase nucléaire clairement détectable, la phase nucléaire des protéines LIM de la famille des zyxines est transitoire, et peut seulement être détectée indirectement (Nix et Beckerle, 1997 ; Petit et al., 2000). Le fait que ces protéines, qui sont normalement cytoplasmiques, puissent transiter du noyau au cytoplasme est considéré comme un exemple de communication entre ces deux compartiments.

En raison de la double localisation de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes, on peut penser que cette protéine remplit deux fonctions bien distinctes, une première dans le noyau, et une seconde dans le cytoplasme.

#### **B. Quel rôle joue la protéine HaWLIM-1 dans le noyau ?**

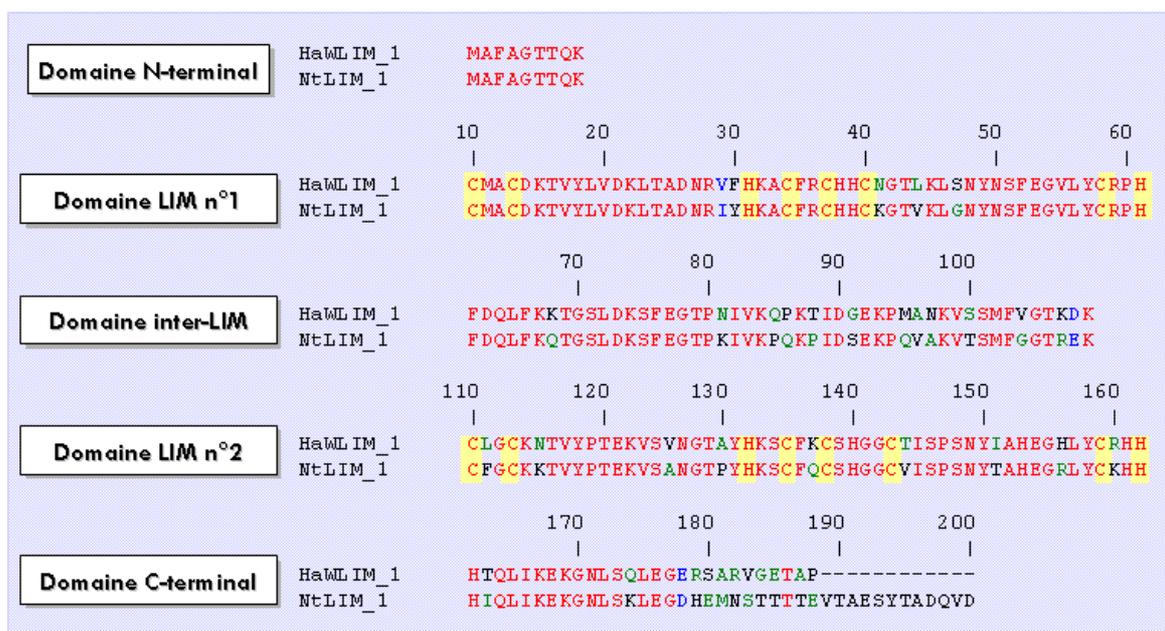
Les protéines animales CRP possèdent une séquence NLS à la suite de chacun de leur domaine LIM. Il est donc logique de les retrouver dans le noyau. Les protéines LIM

végétales sont très proches au niveau structural des protéines CRP, mais elles sont totalement dépourvues de séquences NLS. Il peut donc à priori être surprenant de détecter la protéine HaWLIM-1 dans le noyau des protoplastes. La présence de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau n'est pas une spécificité des protoplastes d'hypocotyles de tournesol, et a déjà pu être observée dans plusieurs autres tissus de tournesol (Mundel *et al.*, 2000). Cependant, à la suite de ces études, utilisant la technique de Fast Red pour l'immunomarquage des tissus, peu de détails ont pu être obtenus sur les structures intranucléaires impliquées. L'approche par immunofluorescence, conjuguée aux observations en microscopie confocale, a permis de préciser la localisation de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau, et révèle que le marquage nucléaire est prédominant dans le nucléole.

La localisation de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la régulation de la transcription. Les observations réalisées sur les protéines LIM nucléaires dans les cellules animales vont dans le sens de cette hypothèse. Il a en effet été démontré que les membres de la famille des protéines CRP pouvaient participer à la transcription (Rabbitts *et al.*, 1997). La protéine CRP-3 / MLP constitue l'exemple le plus parlant. Elle joue en effet un rôle central dans la régulation de la transcription dans les cellules musculaires, grâce à sa capacité à interagir avec les facteurs de transcription Myo D, MRF-4, ainsi qu'avec la myogénine. Ces interactions conduisent à la formation d'un complexe protéique régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation myogénique (Kong *et al.*, 1997).

La caractérisation de la protéine NtLIM-1, une protéine LIM de tabac impliquée dans la biosynthèse de la lignine (Kawaoka *et al.*, 2000) ouvre de nouvelles perspectives dans la détermination de la fonction de la protéine HaWLIM-1 dans le noyau. Cette protéine LIM présente en effet plus de 80 % d'homologie avec la protéine HaWLIM-1 (Fig. 28), et peut donc être considérée comme l'homologue de la protéine HaWLIM-1 chez le tabac. Il a été démontré que la protéine NtLIM-1 possède une activité de liaison à l'ADN, et est capable d'activer transitoirement la transcription du gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase. Cette protéine se fixe sur l'ADN au niveau d'une région promotrice de type PAL-box, ce qui conduit à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Kawaoka *et al.*, 2000). La protéine NtLIM-1 est donc clairement un facteur de transcription. Ces observations montrent pour la première fois qu'une protéine «LIM-only» peut être un facteur de transcription se liant à l'ADN, sans pour autant posséder un homéodomaine dans sa séquence. Une interaction directe avec les acides nucléiques a également été observée pour la protéine LIM végétale HaPLIM-1, sans toutefois pouvoir lui attribuer une fonction spécifique au niveau de l'ADN (Baltz *et al.*, 1996).

En raison de ses très fortes homologies de séquences avec la protéine NtLIM-1, on peut penser que la protéine HaWLIM-1 a effectivement un rôle dans la régulation de la transcription chez le protoplaste d'hypocotyle de tournesol. Cependant, cette protéine s'accumule préférentiellement dans le nucléole, une structure nucléaire dans laquelle est synthétisée la majorité de l'ARN ribosomal, et où certaines protéines ribosomiales s'associent aux ARN ribosomiaux. Il est possible que la protéine HaWLIM-1 participe à l'assemblage des complexes de transcription des gènes correspondant aux ARN ribosomiaux. Elle pourrait également être impliquée dans la régulation de l'assemblage des ribosomes, ou constituer une des protéines structurales des ribosomes.



**Figure 28.** Alignement des séquences peptidiques de la protéine de tournesol HaW<sup>L</sup>LIM-1 et de la protéine de tabac NtLIM-1. Les acides aminés identiques pour les deux séquences apparaissent en rouge, les acides aminés conservés à plus de 90 % en vert, et les acides aminés homologues en bleu. Les résidus histidine et cystéine impliqués dans la coordination des atomes de zinc sont indiqués en jaune. L'alignement entre les deux séquences est réalisé à l'aide du programme « Align » disponible sur le serveur du National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### C. Quel rôle joue la protéine HaWLIM-1 dans le cytoplasme ?

#### La protéine HaWLIM-1 s'associe préférentiellement avec les microtubules.

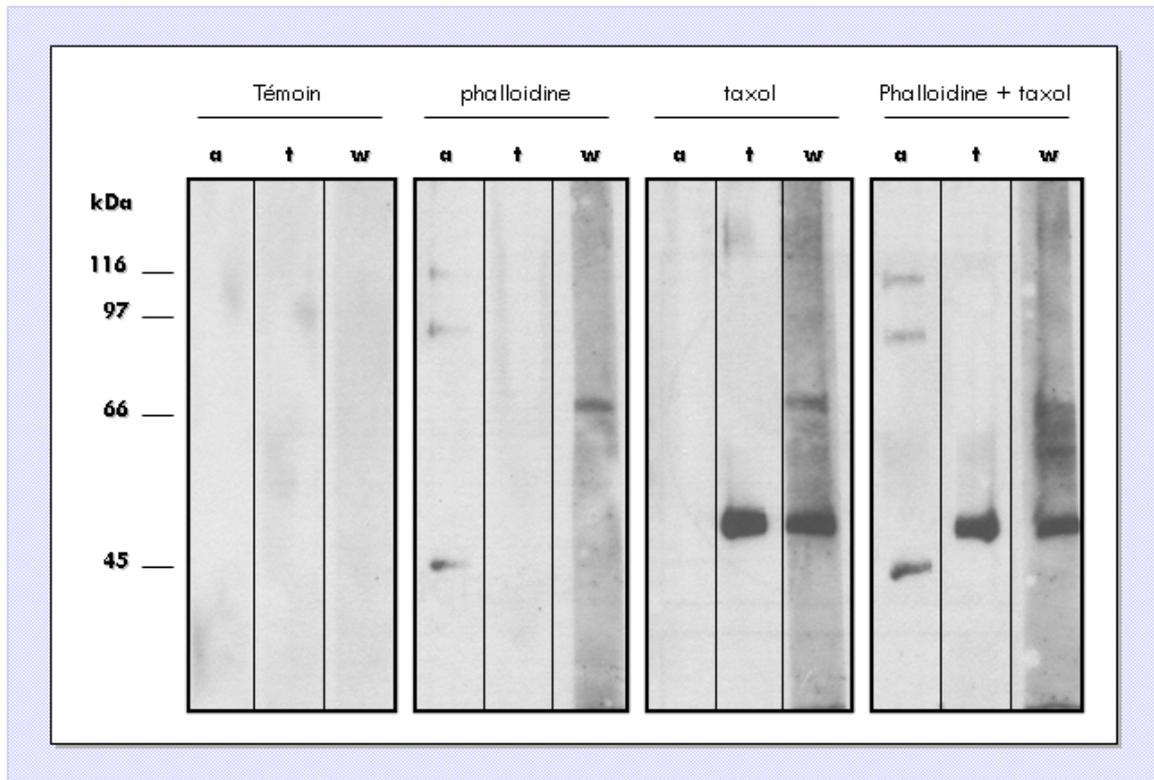
Les protéines CRP, comme beaucoup d'autres protéines LIM animales, sont des composants essentiels de l'organisation du cytosquelette d'actine. Il a été démontré que ces protéines co-localisent avec les microfilaments et les points d'adhésion focaux (Yao *et al.*, 1999). De plus, elles ont la propriété d'interagir avec des protéines directement associées à l'actine : l' $\alpha$ -actinine et la zyxine pour les protéines CRP-1, CRP-2 et CRP-3/MLP (Sadler *et al.*, 1992 ; Pomies *et al.*, 1997 ; Louis *et al.*, 1997), et la  $\beta$ -spectrine pour la protéine CRP-3/MLP (Flick *et Konieczny*, 2000).

Il est désormais admis que les protéines LIM végétales font partie de la famille des protéines CRP (Mundel *et al.*, 2000). Par analogie avec la localisation intracellulaire des protéines CRP, on pouvait donc s'attendre à ce que les protéines LIM végétales soient associées au cytosquelette d'actine. Cela semble être effectivement le cas pour la protéine HaPLIM-1, une protéine LIM de tournesol, qui s'accumule dans les grains de pollen mature au niveau des cônes de germination, des régions particulièrement riches en actine (Baltz *et al.*, 1999). Des sites présentant une colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec les microfilaments d'actine ont également été observés dans les protoplastes de tournesol, mais ils sont peu nombreux et limités à des zones restreintes du cortex.

Ainsi, les études réalisées dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol révèlent que la protéine HaWLIM-1 est préférentiellement associée aux microtubules dans ces cellules. Cette association n'est pas seulement observée au niveau de sites spécifiques, mais est présente tout le long des microtubules. De plus, la protéine HaWLIM-1 peut être copurifiée avec des microtubules stabilisés à l'aide de taxol, ce qui indique une interaction forte de la protéine avec ces structures (Fig. 29) (H. Barthou, communication personnelle).

Il est possible que la colocalisation pouvant être parfois observée entre la protéine HaWLIM-1 et les microfilaments d'actine dans certains tissus (protoplastes ou grains de pollen) soit due au fait que les microtubules et les microfilaments d'actine sont eux-même co-localisés dans certaines zones de la cellule. Il a par exemple été démontré que les microtubules peuvent être co-localisés avec les microfilaments d'actine dans certains types cellulaires, en particulier au niveau du tube pollinique (Lancelle *et Hepler*, 1991).

La protéine HaWLIM-1 peut donc être considérée, pour une de ses fonctions, comme une protéine associée aux microtubules. L'association de la protéine HaWLIM-1 avec les microtubules peut être directe, ou bien s'effectuer par l'intermédiaire d'une ou plusieurs protéines elles-mêmes liées aux microtubules. A notre connaissance, la protéine HaWLIM-1 constitue le premier exemple décrit à ce jour de protéines LIM (animales ou végétales) interagissant avec les microtubules. Cette possibilité d'association aux microtubules pourrait constituer une spécificité des protéines LIM végétales par rapport aux protéines LIM animales, et permet d'élargir le rôle des protéines LIM à l'ensemble des composantes du cytosquelette.



**Figure 29.** Immunodétection des protéines LIM associées au cytosquelette des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

L'actine (a), la tubuline (t) et la protéine HaWLIM-1 (w) sont immunodétectées dans des fractions protéiques non solubles, extraites des protoplastes d'hypocotyles de tournesol avant (Témoin) ou après la stabilisation des microfilaments par la phalloidine, la stabilisation des microtubules par le taxol, ou la stabilisation simultanée des microfilaments et des microtubules par le taxol et la phalloidine. (d'après H. Barthou – Communication personnelle).

### **La protéine HaWLIM-1 est-elle une MAP ?**

Peu de données sont disponibles sur les protéines associées aux microtubules, ou MAP (Microtubules Associated Protein), chez les plantes supérieures. Plusieurs MAPs potentielles ont été décrites chez différentes plantes durant les dix dernières années (Maekawa *et al.*, 1990 ; Yasuhara *et al.*, 1992 ; Chang-Jie et Sonobe, 1993 ; Jablonsky *et al.*, 1993 ; Vantard *et al.*, 1994 ; Nunoue *et al.*, 1995 ; Nick *et al.*, 1995 ; Marc *et al.*, 1996), mais seulement deux MAPs végétales ont pu être clonées (Durso et Cyr, 1994 ; Hugdahl *et al.*, 1995). Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de la dynamique des microtubules, en favorisant leur assemblage ou leur stabilisation. Il a en outre été démontré que certaines de ces MAPs végétales sont impliquées dans des voies de signalisation impliquant les microtubules (Colasanti *et al.*, 1993 ; Durso et Cyr, 1994).

La protéine HaWLIM-1 peut-elle être assimilée à une MAP végétale ? Pour pouvoir être considérée comme une MAP à part entière, la protéine HaWLIM-1 doit remplir plusieurs conditions : (1) elle doit avoir une répartition intracellulaire calquée sur celle des microtubules ; (2) elle doit pouvoir s'attacher de façon spécifique aux tubulines ; (3) elle doit être capable de stabiliser les microtubules et/ou de promouvoir l'assemblage des microtubules *in vitro*.

Nous avons pu démontrer expérimentalement la colocalisation de la protéine HaWLIM-1 sur le réseau microtubulaire. La recherche de motifs protéiques particuliers dans la séquence de HaWLIM-1 par comparaison avec la base de données PROSITE ne révèle pas l'existence de domaines de liaison connus aux tubulines. Cependant, peu de domaines de liaison aux microtubules ont été identifiés et caractérisés à ce jour, que ce soit chez les animaux ou chez les plantes (Narasimhulu et Reddy, 1998). On ne peut donc pas exclure totalement la possibilité de la présence d'un tel domaine sur la protéine HaWLIM-1. Par ailleurs, il est intéressant de noter que certaines MAPs peuvent présenter la même double localisation noyau/cytoplasme que certaines protéines LIM : la protéine de xénope XMAP310 s'accumule exclusivement dans le noyau durant l'interphase, et s'associe avec les microtubules uniquement après la rupture de l'enveloppe nucléaire au début de la mitose (Bach *et al.*, 1997).

Il est encore trop tôt pour affirmer que la protéine HaWLIM-1 peut constituer une nouvelle MAP végétale. Cependant, les données dont nous disposons à l'heure actuelle sont compatibles avec cette hypothèse. Des expériences complémentaires devront être réalisées pour déterminer s'il existe réellement une liaison directe et fonctionnelle entre la protéine HaWLIM-1 et les microtubules. On peut envisager par exemple la réalisation d'un test de polymérisation des microtubules *in vitro* en présence de la protéine HaWLIM-1.

### **La protéine HaWLIM-1 pourrait occuper différentes fonctions au niveau des microtubules.**

Que la protéine HaWLIM-1 interagisse directement avec les microtubules, ou qu'elle soit associée aux microtubules par l'intermédiaire d'une MAP, on peut envisager l'existence de plusieurs fonctions différentes pour la protéine HaWLIM-1 au niveau du réseau de microtubules.

Dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, les anticorps spécifiques de la protéine HaWLIM-1 permettent l'observation d'un marquage ponctiforme au niveau cortical et péri-nucléaire, la protéine HaWLIM-1 semblant se présenter sous forme de clusters répartis de façon plus ou moins régulière le long des microtubules. Un marquage de ce type apparaît comme la forme la plus classiquement observée pour les protéines LIM végétales. Ainsi, on peut retrouver ce marquage pour la protéine HaWLIM-1 dans les cellules méristématiques de racines de tournesol (Mundel et al., 2000). De plus, les études menées sur la protéine HaPLIM-1 ont révélé que, dans les grains de pollen mature de tournesol, la protéine s'accumule au niveau des cônes de germination sous la forme de « taches », et, dans les microspores, sous formes de petits points en nombre limité (Baltz et al., 1999).

L'ensemble de ces observations conduit à se demander si ce marquage de la protéine HaWLIM-1 sous forme de points ou de clusters ne pourrait pas correspondre à des sites de liaisons avec des vésicules du système endomembranaire. La protéine HaWLIM-1 pourrait en effet être impliquée dans le transport de ces vésicules le long des microtubules, et participer ainsi au trafic intracellulaire. Le fait que la protéine HaWLIM-1 soit particulièrement abondante dans les cellules sécrétrices de la tige (Mundel et al., 2000) semble être en accord avec cette possibilité.

Grâce à leur capacité à diriger des interactions moléculaires variées, les protéines LIM animales associées au cytosquelette d'actine jouent un rôle d'interface pour des liaisons protéiques variées, et permettent la localisation de fonctions protéiques diverses au niveau des microfilaments. Plusieurs de ces protéines LIM sont impliquées dans des mécanismes de phosphorylation (Ku et Meier, 2000 ; Tu et al., 1999 ; Zigmond et al., 1998 ; Shen et al., 1998), en particulier la protéine CRP-2, qui constitue un substrat pour la protéine kinase cGMPc (Huber et al., 2000). Il a récemment été suggéré que ces protéines LIM régulent la dynamique des microfilaments d'actine, en constituant des points clés pour des voies de signalisation impliquant des cascades de phosphorylations (Edwards et al., 1999a ; Koukouritaki et al., 1999 ; Maekawa et al., 1999).

On peut donc imaginer que la protéine HaWLIM-1 joue un rôle similaire à ces protéines LIM animales au niveau des microtubules. Elle pourrait participer à l'assemblage de complexes macromoléculaires au niveau des microtubules. Ces complexes pourraient, entre autres, être impliqués, comme ce qui est observé pour l'actine dans les cellules animales, dans une voie de signalisation vers les microtubules impliquant des cascades de phosphorylations. Des sites de phosphorylation potentiels ont pu être mis en évidence sur la séquence protéique de HaWLIM-1, ce qui vient renforcer cette hypothèse.

#### **D. Conclusion.**

Les résultats présentés dans ce chapitre nous ont permis de progresser dans la recherche d'une fonction pour la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Outre le fait que ces protéines soient probablement impliquées dans des complexes protéiques stables, on sait désormais qu'elles peuvent potentiellement jouer deux rôles distincts au sein de la cellule végétale : le premier dans le noyau, et le second dans le cytoplasme en association avec des composantes du cytosquelette.

Il est possible que la protéine HaWLIM-1 remplisse successivement, ou simultanément, ces deux fonctions très différentes, comme cela a pu être observé pour la protéine CRP-3/MLP.

Cette protéine a en effet différents rôles à jouer dans les cellules musculaires suivant leur stade de développement. Dans le noyau des myoblastes en début de différenciation, elle est localisée exclusivement dans le noyau où elle intervient dans la formation de complexes de transcription (Kong *et al.*, 1997). Lorsque les myoblastes ont évolué en myotubes, la protéine CRP-3/MLP acquiert la capacité de transiter vers le cytoplasme où elle est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Arber *et al.*, 1994). Le même cas de figure peut être rencontré pour la protéine SLIMMER (Brown *et al.*, 1999).

La protéine HaWLIM-1 pourrait donc être impliquée dans des processus biologiques très variés : régulation de la transcription, régulation de l'organisation du cytosquelette, transport vésiculaire...L'identification des protéines interagissant directement avec la protéine HaWLIM-1 devrait permettre de préciser le rôle de celle-ci dans ces différents processus.

## CHAPITRE 3

# Etude de la protéine HaWLIM-1 au cours des premières étapes du développement.

Une des spécificités des plantes par rapport à la plupart des autres Eucaryotes supérieurs réside dans leur développement continu, en œuvre dans des régions spécialisées. En effet, les divisions cellulaires, qui déterminent la morphologie générale de la plante, sont confinées au sein des méristèmes, situés aux extrémités de chaque tige et de chaque racine. Seuls ces méristèmes ont la capacité de produire des organes nouveaux tout au long de la vie de la plante.

Cependant, les cellules somatiques conservent la capacité de ré-acquérir un état totipotent, leur permettant de ré-initier un développement. Dans des conditions bien précises, ces cellules vont se dé-différencier, puis exprimer ou réprimer les gènes spécifiques permettant de ré-initier un nouveau cycle cellulaire, puis d'évoluer vers la formation de structures multicellulaires. Par la suite, la plante entière peut être régénérée.

La protéine HaW LIM-1 a-t-elle un rôle à jouer dans ces différents processus ? Plusieurs observations donnent à penser que c'est effectivement le cas. Tout d'abord, nous avons vu dans le chapitre précédent que la protéine HaW LIM-1 est étroitement associée aux microtubules. Or, les microtubules, parce qu'ils interviennent dans la détermination du plan de division de la cellule, et parce qu'ils contrôlent la répartition des chromosomes dans les cellules filles, jouent un rôle central dans la division cellulaire. D'autre part, Mundel et collaborateurs (Mundel et al., 2000) ont détecté la protéine HaW LIM-1 dans des cellules en division, au niveau notamment du phragmoplaste, une région située entre les deux lots de chromosomes fils et participant activement à l'établissement de la plaque cellulaire. Enfin, la protéine HaW LIM-1 présente très fréquemment une localisation intranucléaire, ce qui suggère un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes. Or, dans les cellules animales, les protéines LIM nucléaires sont impliquées dans la régulation de gènes intervenant dans la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que dans le contrôle de l'embryogenèse (pour revue, se reporter au tableau 2 du Chapitre «Données Bibliographiques »).

Pour ces différentes raisons, il semblait intéressant de suivre le devenir de la protéine HaW LIM-1 au cours du développement cellulaire. Au préalable, une étude de l'évolution des protoplastes d'hypocotyles de tournesol au cours de leur culture a été réalisée.

## **I. LE PROCESSUS DE DIVISION CELLULAIRE CHEZ LES PROTOPLASTES D'HYPOCOTYLES DE TOURNESOL.**

Dans le cas de l'hypocotyle de tournesol, lors du passage à l'état de protoplastes, les cellules, en présence d'auxine et de cytokinines, vont se dé-différencier puis entrer progressivement en division, en subissant des modifications successives. Afin de pouvoir suivre leur évolution, ces protoplastes, après leur isolement, sont mis en culture durant huit jours. Une culture en milieu liquide, ainsi qu'une culture sur lamelles après inclusion dans un milieu agarosé, sont réalisées. Les protoplastes sont ensuite observés régulièrement à l'aide d'un microscope inversé.

### **A. La dé-différenciation des protoplastes et la reprise du cycle cellulaire.**

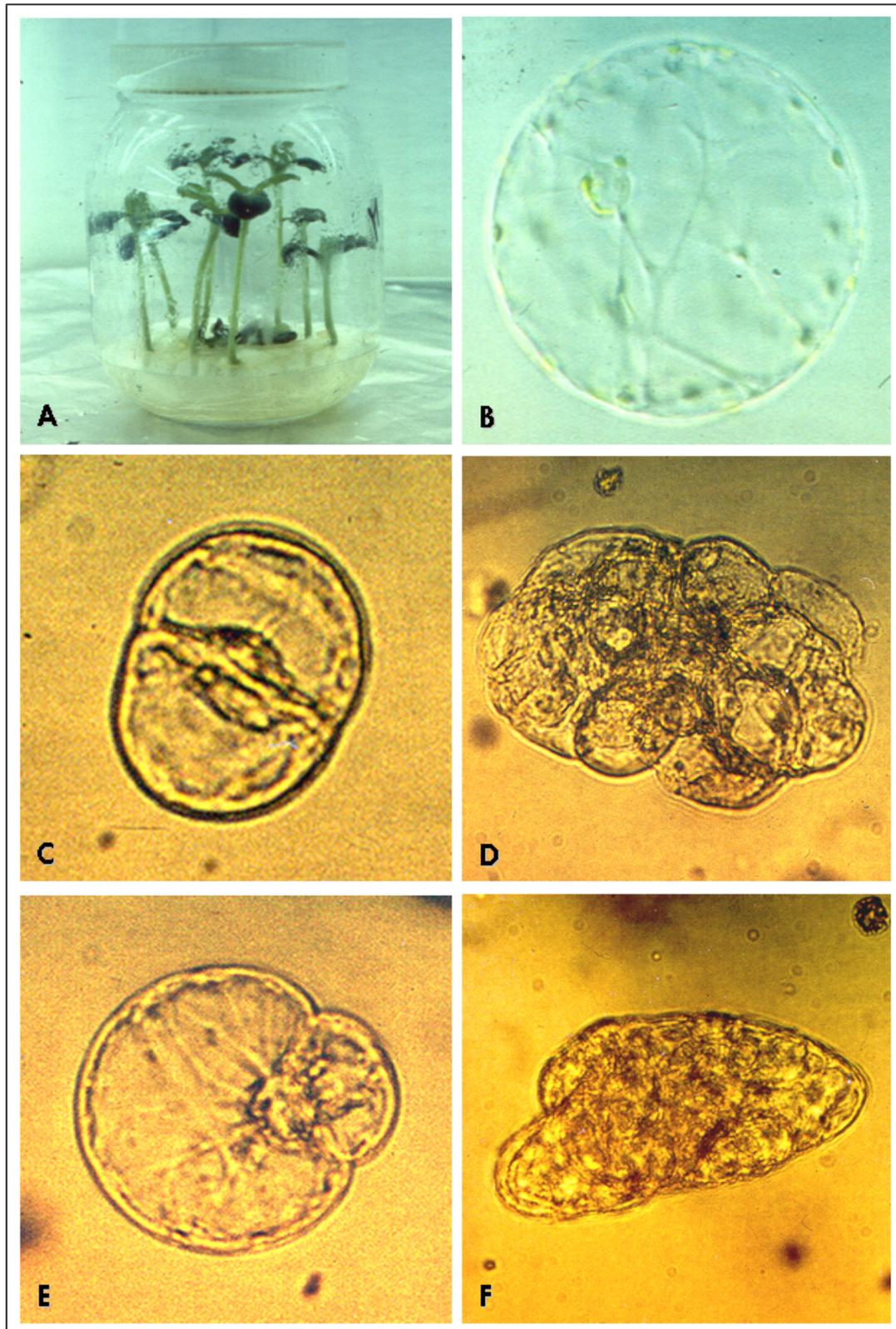
Les protoplastes fraîchement isolés à partir des hypocotyles apparaissent parfaitement sphériques. En outre, leur cytoplasme, peu dense et limpide, comporte encore de nombreux chloroplastes (Fig. 30-B). Ces protoplastes vont immédiatement débiter une étape de dé-différenciation. Ils perdent alors toutes leurs caractéristiques initiales. Les chloroplastes, organites spécifiques des cellules chlorophylliennes différenciées, disparaissent. Le cytoplasme se densifie. La forme des protoplastes devient moins sphérique au fur et à mesure de la reconstitution de la paroi, que l'on peut alors visualiser sous la forme d'un épaissement au niveau de la périphérie des protoplastes. Cette étape de dé-différenciation et de formation de la paroi se déroule sur environ 48 h.

Lorsque leur paroi est presque entièrement re-synthétisée, les protoplastes entament un processus de division. La mitose débute par une phase de réplication de l'ADN et de division nucléaire. Le plan de division se positionne différemment selon le mode de culture des protoplastes. Lorsque les protoplastes sont cultivés en milieu liquide, ils se divisent préférentiellement de manière symétrique (Fig. 30-C). On voit ensuite apparaître au cours des jours suivant des structures multicellulaires inorganisées, appelées microcolonies (Fig. 30-D). On est en présence d'un processus de callogénèse. Par contre, lorsque l'on inclut ces mêmes protoplastes dans une matrice d'agarose, la première division des protoplastes est majoritairement asymétrique (Fig. 30-E). Il en résulte deux cellules de taille inégale. La grande cellule, souvent considérée comme l'homologue du suspenseur caractéristique de l'embryon zygotique, n'évolue pas. La cellule de petite taille se divise au contraire très activement, et est à l'origine de la formation d'une structure multicellulaire dense et compacte, appelée embryoïde (Fig. 30-F). Cette évolution s'apparente à un processus d'embryogénèse somatique.

### **B. Quantification du processus de division cellulaire au cours de la culture des protoplastes.**

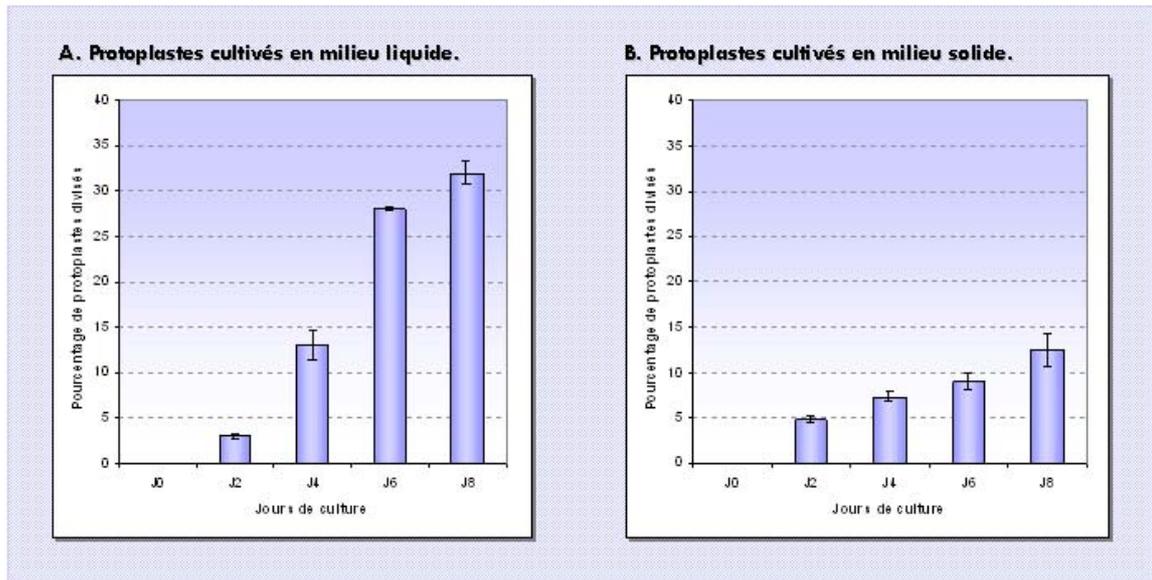
Le processus de division des protoplastes a ensuite été quantifié durant les huit premiers jours de la culture (Fig. 31). Quelles que soient les conditions de culture, les premières divisions cellulaires apparaissent progressivement. Elles sont observables dès le deuxième jour de la culture, que les protoplastes soient cultivés en milieu liquide ou en milieu agarosé. Après huit jours de culture, environ 30 % des protoplastes cultivés en milieu liquide sont entrés en division. Le pourcentage de protoplastes divisés observé lorsque la culture est réalisée en milieu solide est plus faible (environ 12 %). En ce qui concerne leur entrée en division, les protoplastes d'hypocotyles de tournesol ne montrent pas de synchronisation apparente, qu'ils soient cultivés en milieu liquide ou en milieu agarosé.

Nous avons donc pu voir au cours de ces expériences que les huit premiers jours de culture des protoplastes sont riches en événements : dédifférenciation cellulaire, reprise du cycle cellulaire, détermination du développement ultérieur des protoplastes vers la callogénèse ou l'embryogénèse somatique...



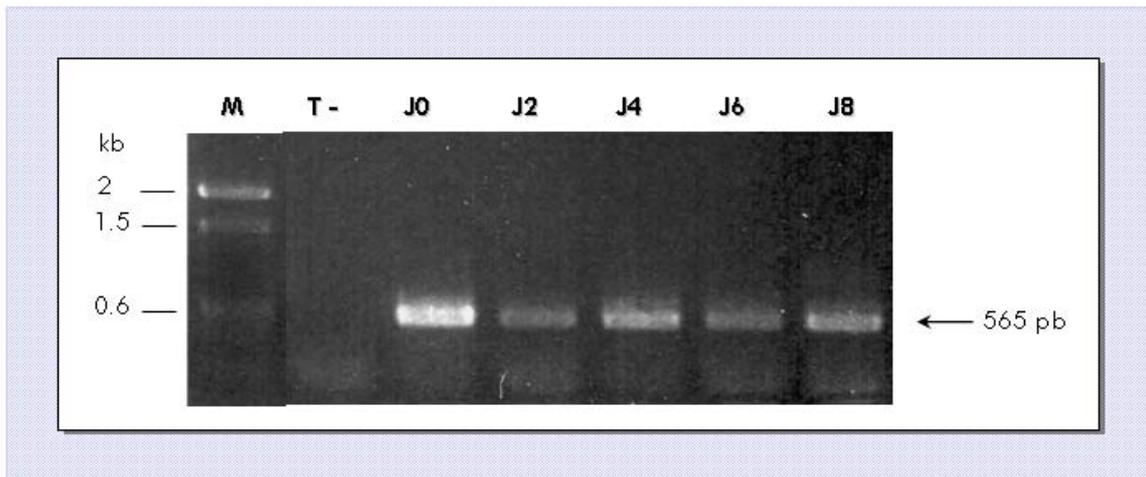
**Figure 30.** Culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

**A.** Plantules de tournesol cultivées *in vitro* pendant 8 jours; **B.** Protoplaste d'hypocotyle de tournesol fraîchement isolé; **C.** Division symétrique d'un protoplaste; **D.** Microcolonie; **E.** Division asymétrique d'un protoplaste; **F.** Embryoïde.



**Figure 31.** Pourcentage de division des protoplastes d'hypocotyles de tournesol au cours de la culture en milieu liquide et de la culture en milieu solide.

Le pourcentage de division est déterminé à partir de trois répétitions de la même expérimentation.



**Figure 32.** Suivi par RT-PCR de l'expression du gène HaWLM-1 au cours de la culture des protoplastes en milieu liquide. PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques du gène HaWLM-1 sur les premiers brins d'ADNc de protoplastes de tournesol cultivés en milieu liquide durant différentes durées. La PCR est également réalisée sur un échantillon ne comportant pas de matrice d'ADNc (T- : témoin négatif).

Pour étudier les mécanismes impliqués dans la différenciation, la division cellulaire et l'embryogenèse, ainsi que l'implication des protéines LIM dans ces processus, il est donc nécessaire et suffisant d'étudier les protoplastes pendant cette période.

## II. EXPRESSION DU GENE *HaWLIM-1* AU COURS DE LA CULTURE DES PROTOPLASTES.

Les études d'expression de la protéine HaWLIM-1 présentées dans le Chapitre 1 ont été réalisées sur des protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolés. Ces protoplastes ne sont pas encore dé-différenciés, et n'ont pas repris d'activité mitotique. Afin de pouvoir ébaucher une fonction possible de la protéine HaWLIM-1 dans les différents processus évoqués précédemment, il est intéressant de suivre dans un premier temps son profil d'expression au cours des premiers jours de culture des protoplastes. L'analyse de cette expression n'a été réalisée que sur des protoplastes cultivés en milieu liquide, en raison des difficultés techniques rencontrées pour l'extraction de molécules, telles que les acides nucléiques ou les protéines, à partir de protoplastes inclus dans une matrice d'agarose.

### A. Etude de l'expression du gène *HaWLIM-1* par RT-PCR.

Les protoplastes, après isolement, sont repris dans du milieu nutritif TLD liquide, et mis en culture durant huit jours. Une fraction des protoplastes est prélevée tous les deux jours, puis les ARN totaux sont extraits pour chaque échantillon. Après rétrotranscription des ARNm, une réaction d'amplification par PCR est réalisée à l'aide des amorces WLIM 450 386 /450 387, spécifiques du gène *HaWLIM-1*.

La figure 32 indique que le gène *HaWLIM-1* s'exprime constamment durant les huit premiers jours de la culture des protoplastes. L'expression de ce gène semble donc indépendante du stade de développement des cellules. Cependant, même si l'expression du gène *HaWLIM-1* est continue durant la culture, il est possible que le niveau d'expression du gène évolue. Afin de vérifier cette possibilité, il est nécessaire de quantifier le niveau d'expression du gène *HaWLIM-1* au cours de la culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

## **B. La RT-PCR comparative : un outil permettant de quantifier l'expression du gène HaWLIM-1 au cours de la culture.**

La quantification de l'expression d'un gène est difficile à réaliser par la technique classique de RT-PCR. Variations dans la quantité réelle d'ADN initial, dans le déroulement de la réaction de PCR, sont autant de facteurs qui peuvent modifier l'intensité de l'amplification d'un échantillon à un autre, et donc l'intensité du marquage sur le gel d'agarose. Il est donc délicat de comparer directement sur le gel les différences d'intensité existant entre différents échantillons.

La technique généralement utilisée pour quantifier de façon précise l'expression d'un gène est une analyse par hybridation de type Northern utilisant la comparaison avec un témoin interne stable, généralement les ARNr 28S. Cependant, les quantités relatives en ARNm correspondant au gène *HaWLIM-1* dans les différents tissus et organes de tournesol sont si faibles que la détection en Northern blot de ces ARN est très difficile (Mundel et al., 2000). Cette analyse n'a donc pas été réalisée sur les protoplastes.

Une autre technique permettant une approche quantitative de l'analyse de l'expression d'un gène est la RT-PCR comparative, ou semi-quantitative. Elle consiste à réaliser une amplification à l'aide d'amorces spécifiques du gène étudié, et d'amorces spécifiques d'un gène d'expression constitutive utilisé comme témoin interne. Cette amplification est menée à partir de quantité d'ADNc identiques, afin de pouvoir par la suite comparer l'intensité des signaux obtenus.

### **B1. Le choix d'un témoin d'expression constitutive.**

Dans la littérature, on peut trouver plusieurs gènes couramment utilisés comme témoin d'expression constitutive en RT-PCR comparative, à savoir les gènes de l'actine, de la tubuline, de la calmoduline et de l'ubiquitine. Cependant, pour pouvoir disposer des amorces PCR correspondantes, il est nécessaire que ces gènes aient été précédemment clonés et séquencés chez la plante d'intérêt.

Pour réaliser la RT-PCR comparative sur les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, la principale difficulté est de choisir le témoin interne le mieux adapté à ce matériel végétal. Parmi les gènes précédemment cités, seul le gène de la calmoduline a été séquencé chez le tournesol (Courbou et al., 1997). Le gène de l'actine n'a à ce jour pas été séquencé chez le tournesol, mais nous avons à notre disposition des amorces PCR spécifiques du gène de l'actine de poire capables de donner un produit d'amplification spécifique à partir d'ADNc de tournesol (V. Legrand – communication personnelle). Nous avons donc choisi deux témoins internes pour la réalisation des expériences de RT-PCR comparatives sur les protoplastes de tournesol : le gène de la calmoduline et le gène de l'actine.

### **B2. La stratégie retenue pour l'amplification.**

Pour pouvoir comparer l'intensité de l'amplification entre le gène d'intérêt et le gène témoin, il est indispensable de réaliser les deux réactions PCR différentes à partir de quantité d'ADNc rigoureusement identiques. La méthode la plus fiable consiste à réaliser les deux amplifications simultanément sur une matrice d'ADNc unique. Il est cependant nécessaire dans ce cas que les deux couples d'amorces utilisés (amorces spécifiques du

gène d'intérêt et amorces spécifique du gène témoin) conduisent à l'obtention de deux produits d'amplification de taille distincte, pouvant être individualisés lors de l'électrophorèse.

Les amorces PCR dont nous disposons pour ces expériences conduisent à l'obtention de produits d'amplification de taille théorique égale à 565 pb pour le gène *HaWLIM-1*, 443 pb pour le gène de la calmoduline, et 535 pb pour le gène de l'actine. Les amorces spécifiques du gène *HaWLIM-1* et du gène de la calmoduline, conduisant à des produits d'amplification de taille suffisamment différente, peuvent donc être utilisées simultanément.

### **B3. L'expression du gène *HaWLIM-1* semble diminuer au cours de la culture des protoplastes.**

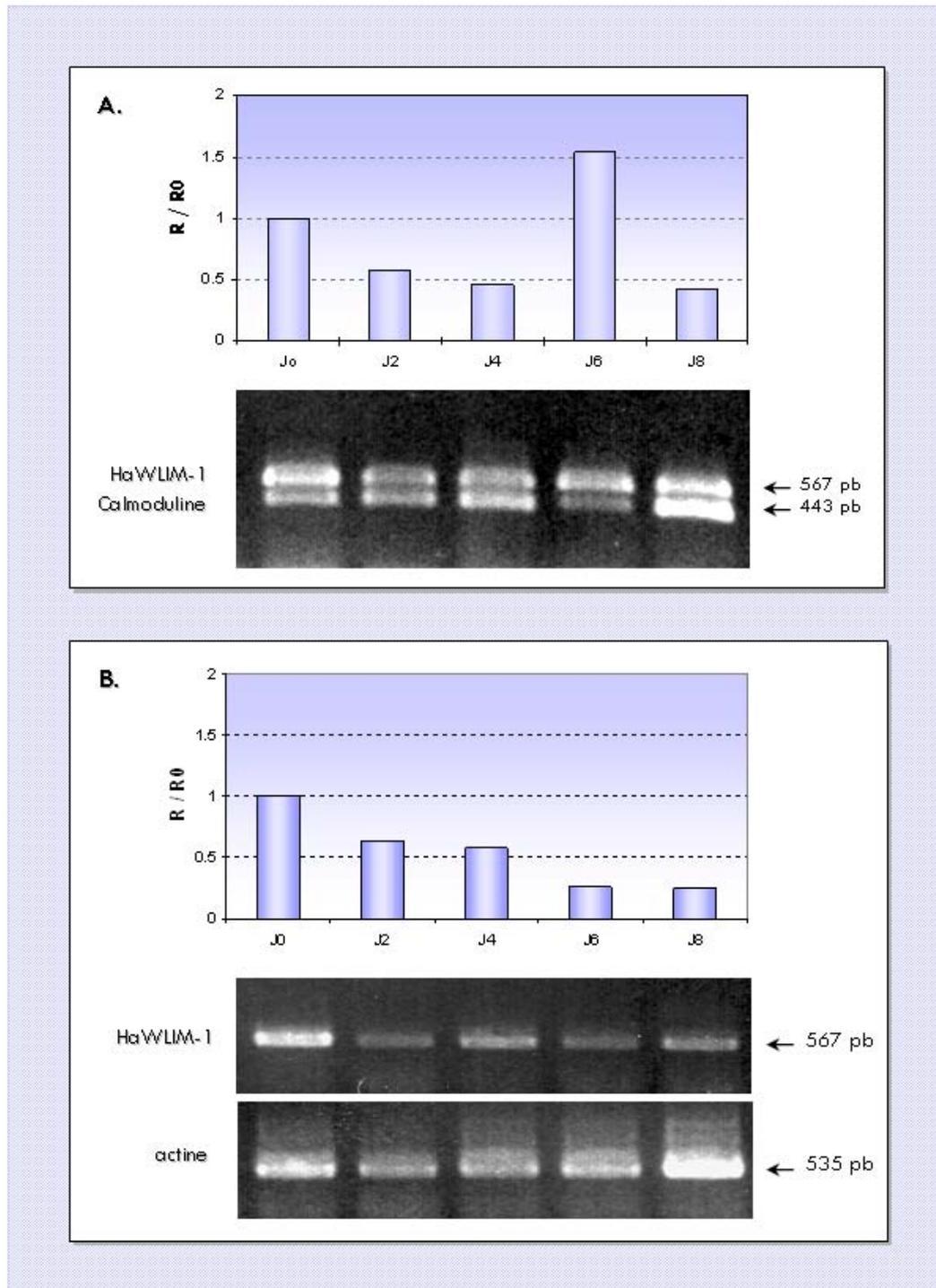
La réaction d'amplification par PCR est réalisée sur des premiers brins d'ADNc issus de protoplastes d'hypocotyles de tournesol, soit en utilisant simultanément sur une même matrice d'ADNc les amorces spécifiques du gène *HaWLIM-1* et les amorces spécifiques du gène de la calmoduline (Fig. 33-A), soit en utilisant séparément les amorces spécifiques du gène *HaWLIM-1* et du gène de l'actine sur des quantités équivalentes d'ADNc (Fig. 33-B). Pour chaque durée de culture, l'intensité du signal obtenu pour le gène *HaWLIM-1* est comparée à l'intensité du signal obtenu pour le gène témoin, puis le rapport entre les deux intensités est calculé ( pour plus de précisions sur la détermination de ce rapport, se reporter au chapitre « Matériels et Méthodes »).

Sur la figure 33, on peut voir que, au tout début de la culture des protoplastes, l'expression du gène *HaWLIM-1* est assez importante. Si on observe de façon globale l'ensemble des résultats, il semble que l'expression du gène *HaWLIM-1* diminue au cours du temps. Cependant, les résultats obtenus avec les deux stratégies d'amplification sont contradictoires, puisque lorsqu'on utilise le gène de la calmoduline comme témoin interne, on peut noter une augmentation transitoire et importante de l'expression du gène *HaWLIM-1* au sixième jour de culture, alors que cette augmentation est absente dans le cas de l'utilisation du gène de l'actine.

### **B4. Comment optimiser la technique de RT-PCR comparative ?**

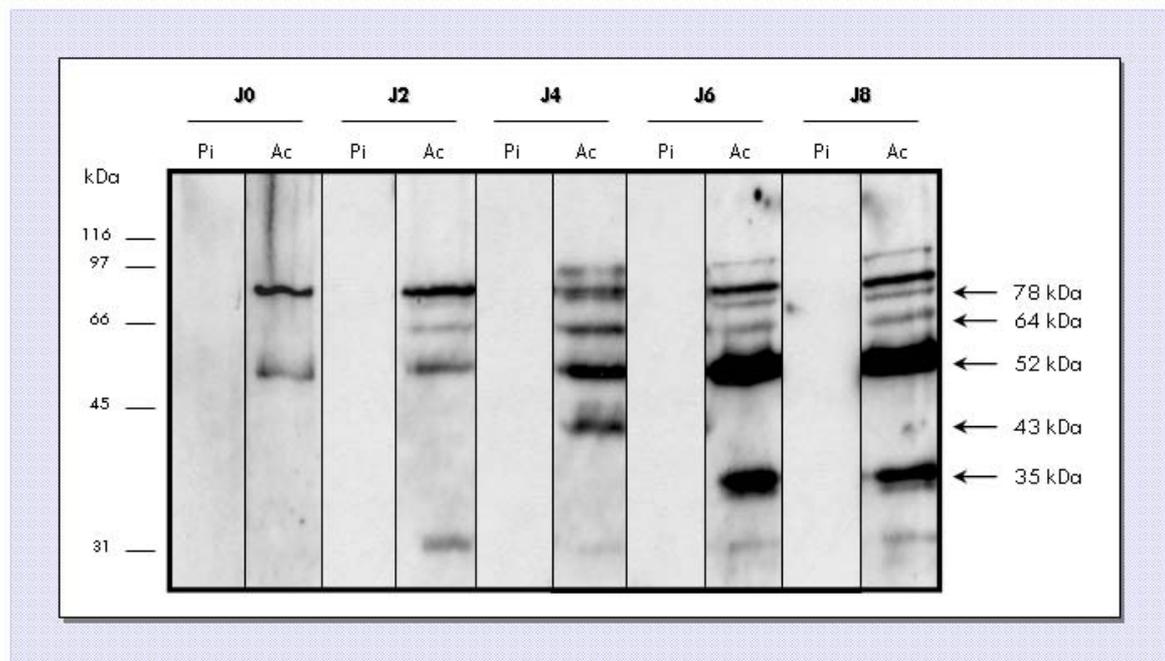
Ces observations doivent donc être considérées uniquement comme une approche préliminaire de l'étude du niveau d'expression du gène *HaWLIM-1* au cours de la culture des protoplastes. En effet, trop d'incertitudes persistent encore quant à la fiabilité de la technique de RT-PCR comparative telle qu'elle a été utilisée dans ces expériences.

Le choix d'un témoin interne d'expression constitutive chez les protoplastes de tournesol pose certains problèmes. A l'heure actuelle, seul le gène de la calmoduline est séquencé chez le tournesol, ce qui permet de choisir et d'obtenir des amorces spécifiques parfaitement bien adaptées à l'expérimentation. Cependant, même si ce gène est considéré comme un bon témoin d'expression constitutive dans certaines conditions, son expression peut également être induite en cas de stress (Bergey et Ryan, 1999 ; Vian et al., 1996). Or les protoplastes sont des entités particulièrement fragiles et particulièrement exposées au moindre stress. L'utilisation du gène de la calmoduline comme témoin chez les protoplastes peut donc fausser les résultats obtenus. Le gène de l'actine semble constituer un témoin plus fiable, mais les amorces dont nous disposons à l'heure actuelle ne sont pas adaptée à une amplification simultanée.



**Figure 33.** Analyse quantitative de l'expression du gène HaWVLM-1 au cours de la culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol en milieu liquide.

PCR réalisée sur les premiers brins d'ADNc issus de protoplastes cultivés durant différentes périodes, en utilisant simultanément sur une même matrice d'ADN les amorces spécifiques du gène HaWVLM-1 et les amorces spécifiques du gène de la calmoduline (**A**), ou en utilisant les amorces spécifiques du gène HaWVLM-1 et du gène de l'actine sur des quantités équivalentes d'ADN (**B**). Pour chaque durée de culture, l'intensité du signal obtenu pour le gène HaWVLM-1 est comparée à l'intensité du signal obtenu pour le témoin d'expression constitutive, puis le rapport entre les deux intensité est calculé. Les valeurs sont exprimées en prenant comme référence le rapport à J0 = 1.



**Figure 34.** Immunodétection de la protéine HaWVLM-1 au cours de la culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol en milieu liquide.

Les protoplastes sont prélevés à intervalles réguliers au cours de la culture, les protéines totales sont extraites, séparées sur gel d'acrylamide, et mises en présence des anticorps anti-HaWVLM-1 (Ac) ou du sérum pré-immun correspondant (Pi), utilisés à la concentration de 1 : 10 000e.

Le fait que le gène de l'actine ne soit pas séquencé chez le tournesol ne nous permet pas de disposer d'un grand choix d'amorces susceptibles de conduire à l'amplification de ce gène à partir d'ADNc de protoplastes de tournesol.

Ce problème nécessite donc d'être levé avant de pouvoir étudier plus en détail l'évolution de l'expression du gène HaWLIM-1 au cours de la culture des protoplastes.

### **C. Etude de la protéine HaWLIM-1 par immunoblot.**

Nous avons vu au Chapitre 1 que, dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol fraîchement isolés, la protéine HaWLIM-1 n'est pas présente sous forme de monomère, mais est impliquée dans plusieurs polypeptides distincts, de masses moléculaires respectivement égales à 52 kDa, 64 kDa et 78 kDa. D'autre part, les expériences de RT-PCR présentées précédemment indiquent que la protéine HaWLIM-1 est présente dans les protoplastes pendant toute la durée de leur culture. La protéine HaWLIM-1 garde-t-elle la même répartition au sein de la cellule pendant la division cellulaire ?

Afin de répondre à cette question, des protoplastes sont prélevés régulièrement pendant la culture en milieu liquide, les protéines totales sont extraites, séparées sur gel d'acrylamide, et mises en présence des anticorps anti-HaWLIM-1 ou du sérum pré-immun correspondant. Pour les raisons décrites précédemment, cette étude n'a été réalisée que sur des protoplastes cultivés en milieu liquide.

La figure 34 indique que les anticorps anti-HaWLIM-1 reconnaissent un plus grand nombre de polypeptides dans les protoplastes en culture que dans les protoplastes fraîchement isolés. Les deux polypeptides de 52 kDa et 78 kDa, détectés initialement dans les protoplastes fraîchement isolés, sont présents durant les huit premiers jours de culture. Le polypeptide de 52 kDa voit cependant son abondance augmenter au cours du temps, contrairement au polypeptide de 78 kDa dont la quantité relative évolue peu.

Cette expérience permet également de mettre en évidence l'apparition de nouveaux polypeptides au cours de la culture des protoplastes. Ces polypeptides présentent des masses moléculaires généralement plus faibles que celles observées avant la culture. Les masses moléculaires des trois principaux polypeptides détectés sont respectivement de 64 kDa, 43 kDa et 35 kDa. Le polypeptide de 64 kDa, dont la présence avait déjà été observée sur certains échantillons de protoplastes fraîchement isolés (se reporter au Chapitre 1), apparaît dans les tous premiers jours de la culture et se maintient dans le temps. Ce polypeptide semble donc apparaître très rapidement après la fin de l'isolement des protoplastes, et pourrait jouer un rôle dans le processus de dé-différenciation cellulaire. Le polypeptide de 43 kDa n'apparaît que transitoirement au quatrième jour de culture, puis disparaît. Le polypeptide de 35 kDa apparaît au sixième jour, et est toujours présent au huitième jour de culture. La reconnaissance de ces nouveaux polypeptides par les anticorps anti-HaWLIM-1 est bien spécifique, puisqu'ils ne sont pas reconnus par le sérum pré-immun.

Les anticorps anti-HaWLIM-1 reconnaissent donc un grand nombre de nouveaux polypeptides lorsque les protoplastes sont mis en culture. Le polypeptide de 35 kDa pourrait correspondre à la forme monomérique de la protéine HaWLIM-1. La reconnaissance de nouveaux polypeptides de masse moléculaire supérieure à 35 kDa par

les anticorps anti-HaWLIM-1 semble indiquer que la protéine HaWLIM-1 possède la capacité de s'associer et de se dissocier avec de nouveaux complexes protéiques au cours du développement des protoplastes.

### **III. LOCALISATION DE LA PROTEINE HaWLIM-1 AU COURS DE LA CULTURE DES PROTOPLASTES.**

Les expériences présentées par la suite ont été réalisées en parallèle sur des protoplastes cultivés en milieu liquide et sur des protoplastes cultivés en milieu agarosé. Les résultats obtenus étant similaires dans les deux cas, il ne sera pas fait de distinction entre les deux conditions de culture.

#### **A. Evolution du cytosquelette au cours de la culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.**

Le cytosquelette est une structure très dynamique. Au cours de l'isolement des protoplastes et de leur culture, ce cytosquelette subit de multiples modifications, que ce soit au niveau des microtubules ou au niveau des microfilaments d'actine.

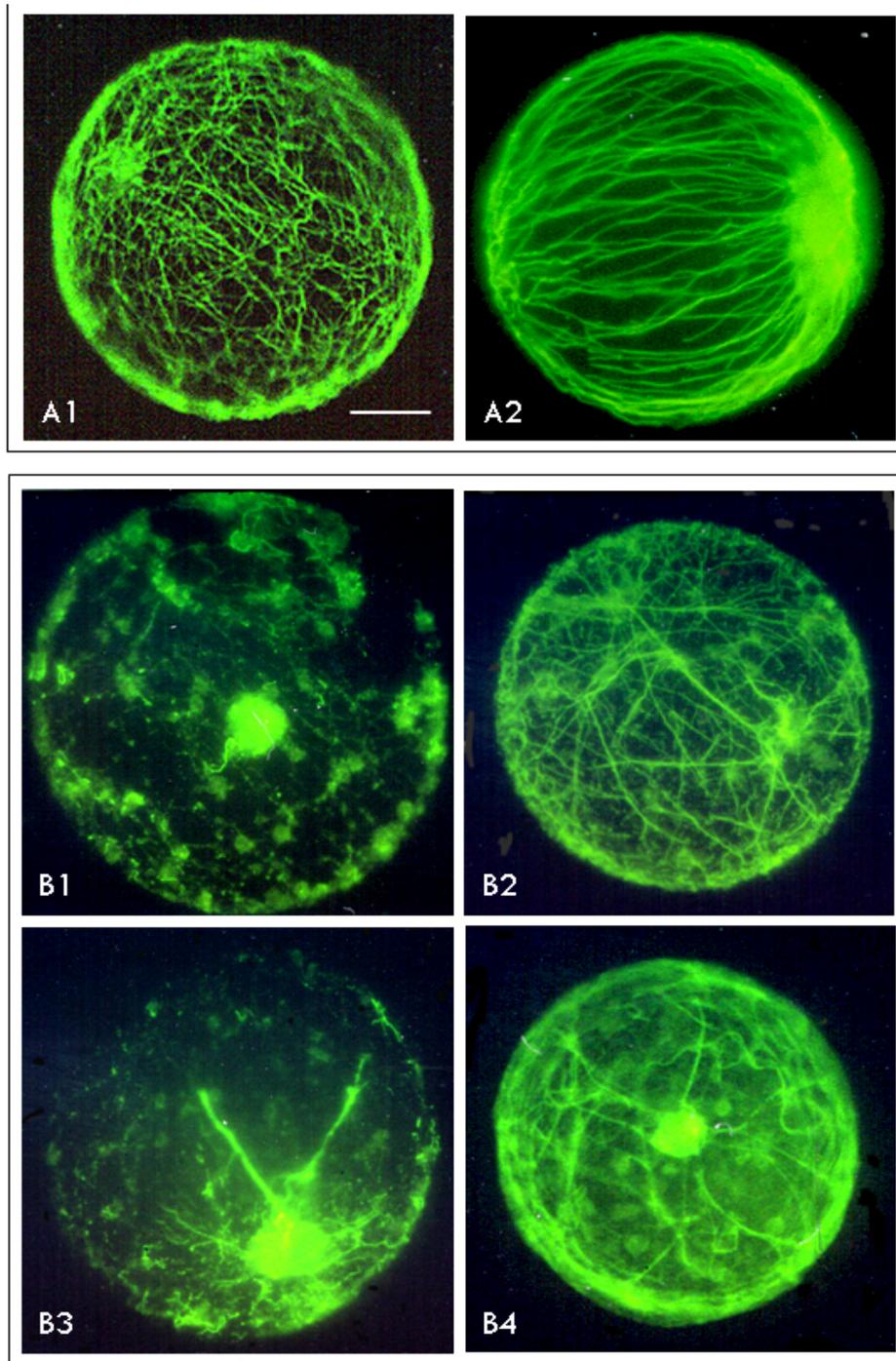
Afin de pouvoir observer la dynamique de leur cytosquelette au cours de la culture, les protoplastes sont prélevés à intervalles réguliers au cours de la culture, fixés, puis les microtubules ou les microfilaments d'actine sont révélés par l'utilisation d'anticorps adéquats.

##### **A1. Evolution du cytosquelette après l'isolement des protoplastes : cellules en interphase.**

Au cours de l'isolement des protoplastes, des transformations importantes se produisent, en relation avec la digestion de la paroi cellulaire, au niveau de l'organisation du cytosquelette.

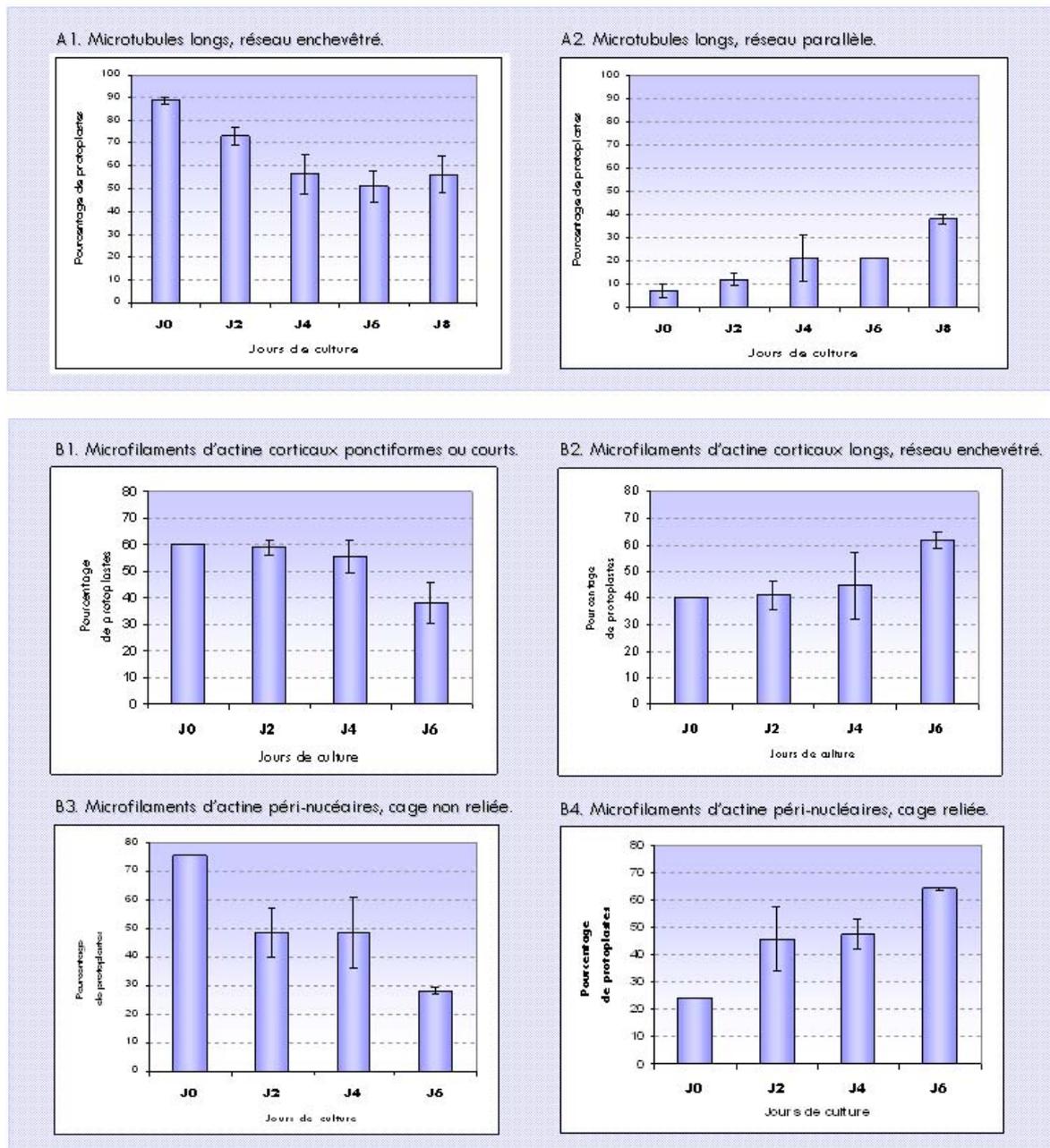
La dynamique des microtubules est ainsi particulièrement modifiée. Environ 90 % des protoplastes fraîchement isolés sont caractérisés par un réseau de microtubules corticaux enchevêtrés, de type inorganisé (Fig. 35-A1). Au cours des premiers jours de culture, ces protoplastes vont progressivement ré-organiser leurs microtubules, qui vont s'aligner les uns par rapport aux autres, et former un réseau cortical parallèle (Fig. 35-A2).

Les modifications engendrées au niveau des microfilaments d'actine sont plus diverses, et donc plus complexes à appréhender. Il est nécessaire d'observer les microfilaments d'actine à la fois au niveau cortical, cytoplasmique, et péri-nucléaire.



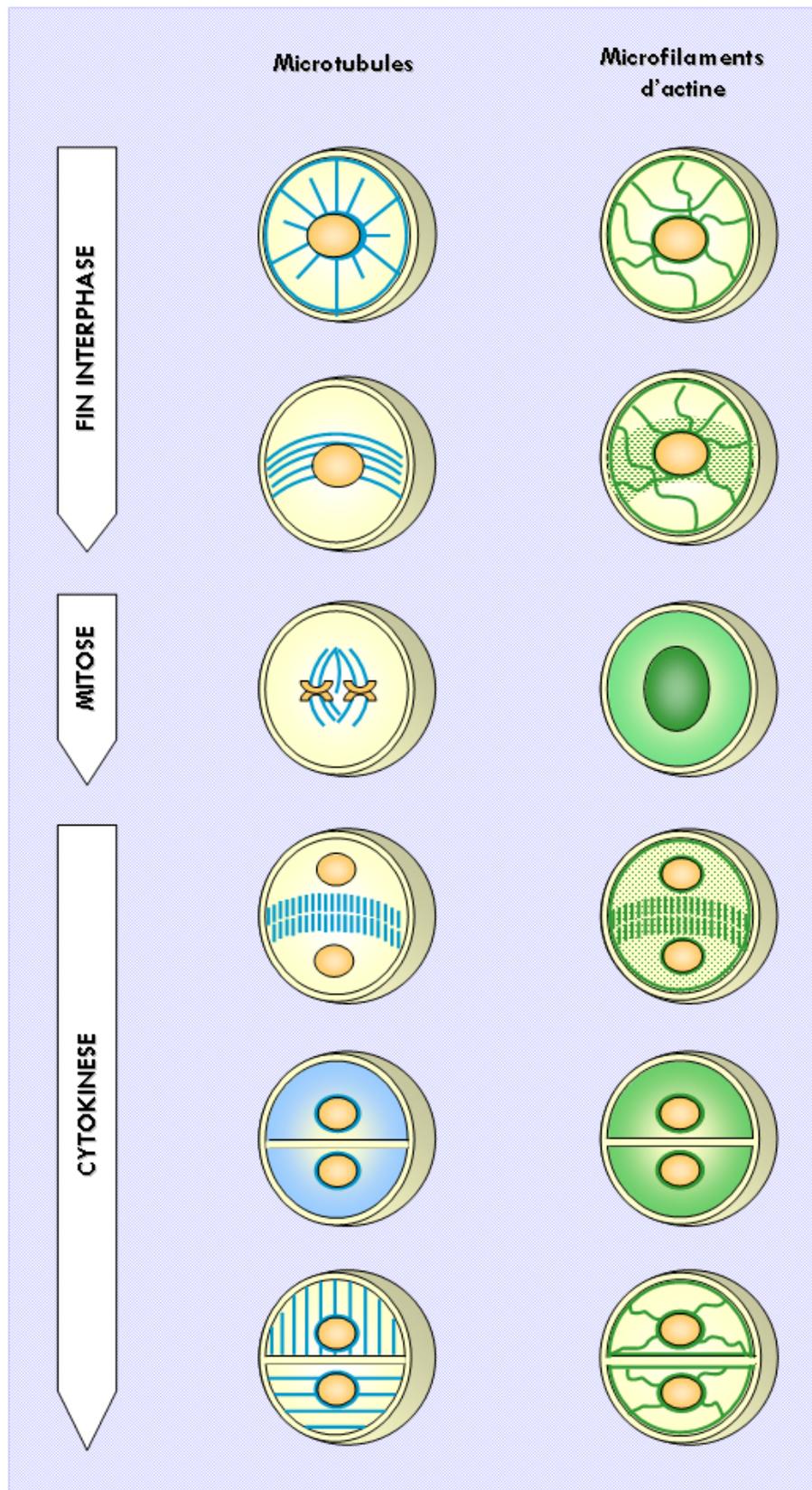
**Figure 35.** Immunocytochemical localization of the cytoskeleton during the culture of protoplasts of turnip hypocotyls.

**A.** Staining of microtubules using anti- $\beta$ -tubulin antibodies associated with a secondary antibody coupled to FITC (A1) Protoplast presenting disorganized cortical microtubules (A2) Protoplast presenting organized parallel cortical microtubules. **B.** Staining of actin filaments using anti-actin antibodies associated with a secondary antibody coupled to FITC (B1) Protoplast presenting short or punctate cortical actin filaments (B2) Protoplast presenting long cortical actin filaments (B3) Protoplast presenting a non-connected perinuclear actin cage (B4) Protoplast presenting a perinuclear actin cage connected to the cortical network. (bar = 10  $\mu$ m).



**Figure 36.** Dynamique du cytosquelette lors de la culture des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

**A.** Dynamique des microtubules (A1) pourcentage de protoplastes présentant des microtubules corticaux non organisés (A2) pourcentage de protoplastes présentant des microtubules corticaux organisés en faisceaux parallèles. **B.** Dynamique des microfilaments d'actine (B1) pourcentage de protoplastes présentant des microfilaments corticaux courts ou pontiformes (B2) pourcentage de protoplastes présentant des microfilaments corticaux longs (B3) pourcentage de protoplastes présentant une cage péri-nucléaire de microfilaments non reliée au réseau cortical (B4) pourcentage de protoplastes présentant une cage péri-nucléaire de microfilaments reliée au réseau cortical.



**Figure 37.** Représentation schématique des modifications apparaissant au niveau du cytosquelette lors de la division des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

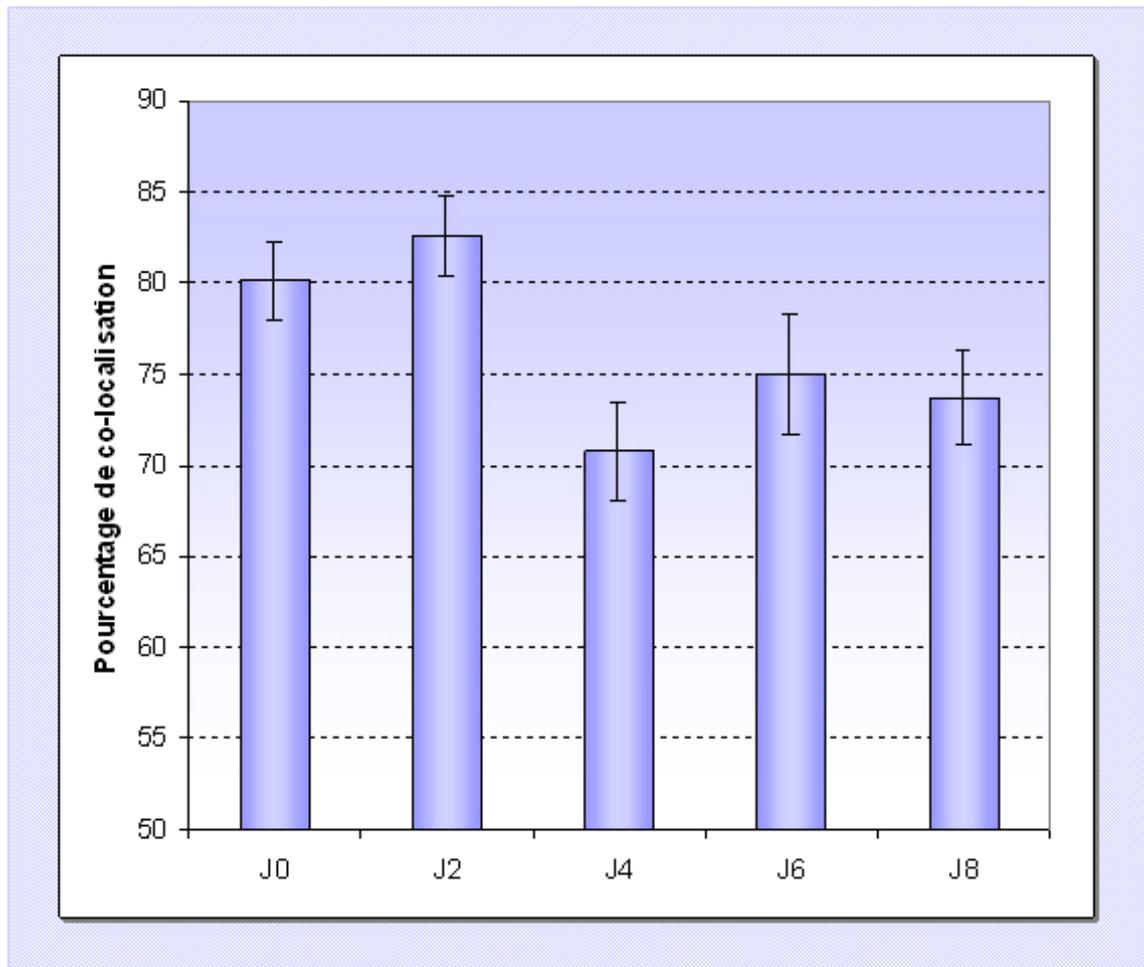
La figure 36 présente l'évolution des différentes catégories de protoplastes au cours de la culture. A la fin de l'isolement, la majorité des protoplastes présentent des microfilaments d'actine courts ou ponctiformes, sans organisation particulière (Fig. 35-B1). La cage de microfilaments entourant le noyau est « libre » dans le cytoplasme (Fig. 35-B3). Au cours des premiers jours de culture, les microfilaments s'allongent, le réseau cortical se densifie (Fig. 35-B2), et on voit apparaître des câbles cytoplasmiques reliant le réseau d'actine péri-nucléaire au réseau cortical (Fig. 35-B4).

## **A2. Evolution du cytosquelette au cours du cycle cellulaire.**

Le cytosquelette des plantes supérieures subit des modifications au cours des différentes étapes du cycle cellulaire.

Au cours de la division cellulaire, quatre systèmes microtubulaires peuvent être observés successivement (Fig. 37). L'un des premiers signes indiquant l'entrée de la cellule en mitose est l'apparition d'un réseau dense de microtubules émanant de la surface nucléaire et irradiants vers le cortex de la cellule. Lors de l'étape suivante, le réseau cortical et le réseau radial disparaissent pour faire place à une large bande circulaire de nature fibrillaire, la bande préprophasique. Cette structure se présente sous la forme d'un anneau cortical qui prédétermine le plan de division de la cellule. Sa localisation marque le site du futur phragmoplaste où sera synthétisée la paroi séparant les deux cellules filles. L'apparition de la bande préprophasique a lieu bien avant la condensation du matériel nucléaire. Elle apparaît en phase G2 du cycle cellulaire sous forme d'une bande large qui se resserre en prophase et disparaît progressivement en fin de prophase. Dès le début de la métaphase, le marquage des microtubules prend une forme diffuse, en raison de la résolution du réseau microtubulaire au moment de la duplication de l'ADN. Les seuls microtubules visibles sont les microtubules constitutifs du fuseau mitotique. A la suite de la séparation des chromosomes, la localisation de la plaque cellulaire est marquée par un nouveau réseau de microtubules, le phragmoplaste, qui apparaît sous la forme d'un double-anneau de microtubules courts et imbriqués. Les microtubules constitutifs du phragmoplaste permettent le transport de vésicules contenant les composés nécessaires à la néosynthèse de la paroi. Dans les tous premiers temps de l'interphase suivante, les microtubules irradient à partir de l'enveloppe nucléaire vers le cytoplasme. Les microtubules se repolymérisent alors progressivement dans chaque cellule fille, et reprennent leur aspect initial.

Le cytosquelette d'actine intervient de façon beaucoup moins importante que les microtubules dans le déroulement du cycle cellulaire. L'aspect du réseau de microfilaments subit néanmoins quelques modifications durant cette période (Fig. 37). Les cellules interphasiques possèdent un réseau de microfilaments bien développé et dense. A la fin de l'interphase, certains microfilaments viennent interagir avec les microtubules constitutifs de la bande préprophasique, mais sans que cela affecte de façon importante l'aspect du cytosquelette d'actine. Les microfilaments d'actine ne sont pas impliqués dans le déroulement de la mitose des cellules végétales. Pendant ce processus, il y a résolution du réseau d'actine, les microfilaments persistants formant une cage autour du fuseau mitotique. Par contre, les microfilaments sont activement impliqués dans certaines étapes de la cytokinèse, et interviennent au niveau du phragmoplaste en association avec les microtubules.



**Figure 38.** Quantification de la fréquence de co-localisation entre la protéine HaWLM-1 et les microtubules dans les cellules en interphase au cours de la culture.

## **B. Evolution des interactions entre la protéine HaWLIM-1 et les composantes du cytosquelette au cours de la culture des protoplastes.**

L'organisation du cytosquelette est donc fortement modifiée au cours du processus de division cellulaire. La protéine HaWLIM-1, qui est étroitement associée aux microtubules, voit-elle sa localisation évoluer en fonction de ces modifications ?

### **B1. Dans les cellules en interphase.**

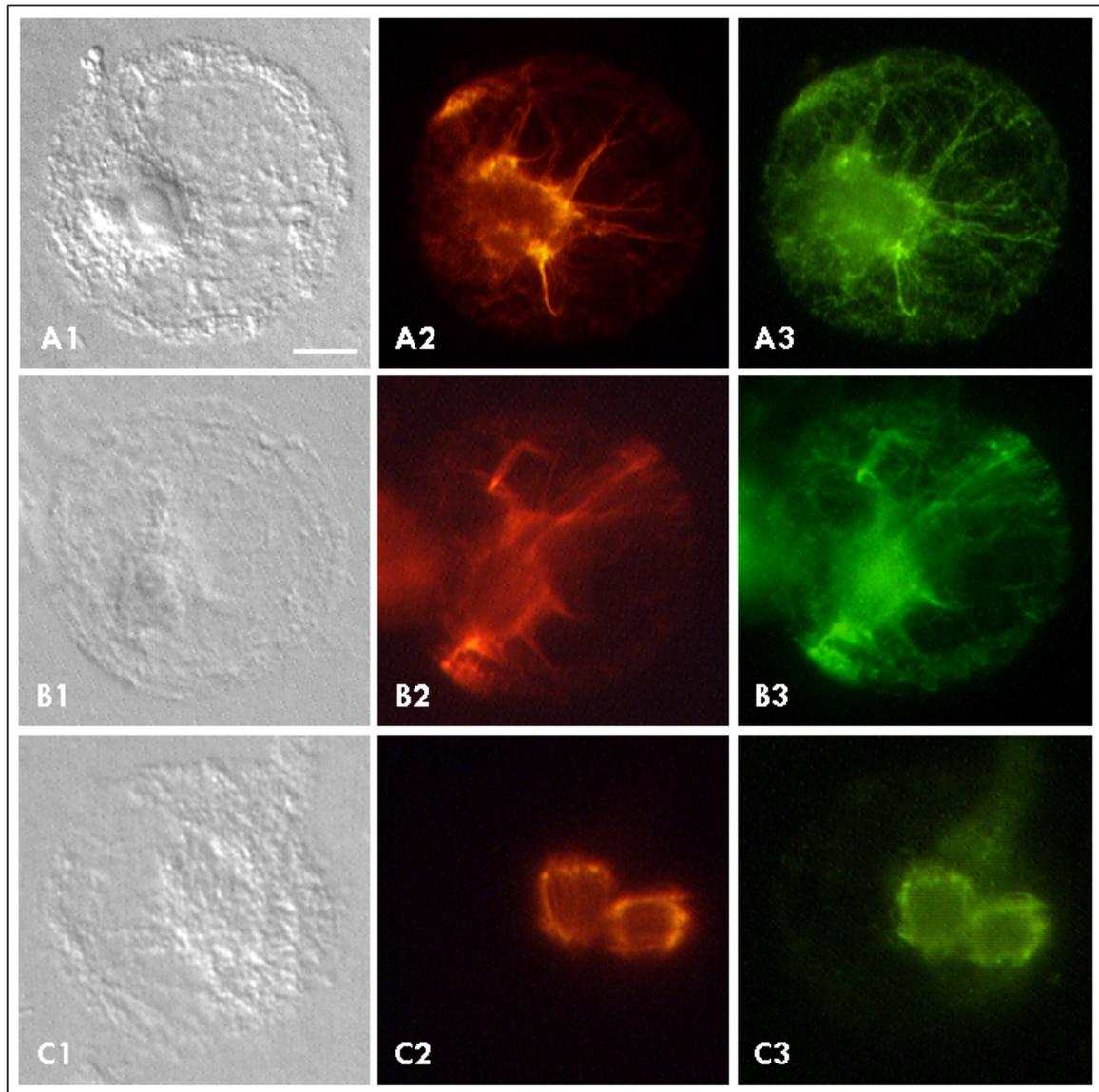
Dans les cellules en interphase, le cytosquelette, actine ou microtubules, est dense et présente une organisation bien définie. Il est donc possible de quantifier la colocalisation existant entre la protéine HaWLIM-1 et les composantes du cytosquelette. Les cellules constituant une suspension de protoplastes entrent en division de façon non synchrone. On peut donc observer des cellules en interphase pendant toute la durée de la culture, ce qui permet d'analyser l'évolution de ces cellules interphasiques juste avant leur entrée en division. Nous avons donc quantifié la fréquence de colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec les microtubules dans les cellules en interphase durant les premiers jours de la culture. La quantification de la fréquence de colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec l'actine n'a pas pu être réalisée, en raison de la mauvaise qualité du marquage de l'actine dans les protoplastes en culture (se reporter au Chapitre « Matériels et Méthodes »).

Lorsque l'on analyse les résultats présentés sur la figure 38, on remarque que la colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec les microtubules a tendance à diminuer légèrement au cours de la culture des protoplastes. Cette diminution intervient à partir du quatrième jour de culture, ce qui correspond à la période où l'entrée en division des cellules devient plus massive. Si on s'en réfère à cette observation, il semblerait que la protéine HaWLIM-1 ait tendance à « se décrocher » des microtubules avant l'entrée en division du protoplaste.

### **B2. Dans les cellules en division.**

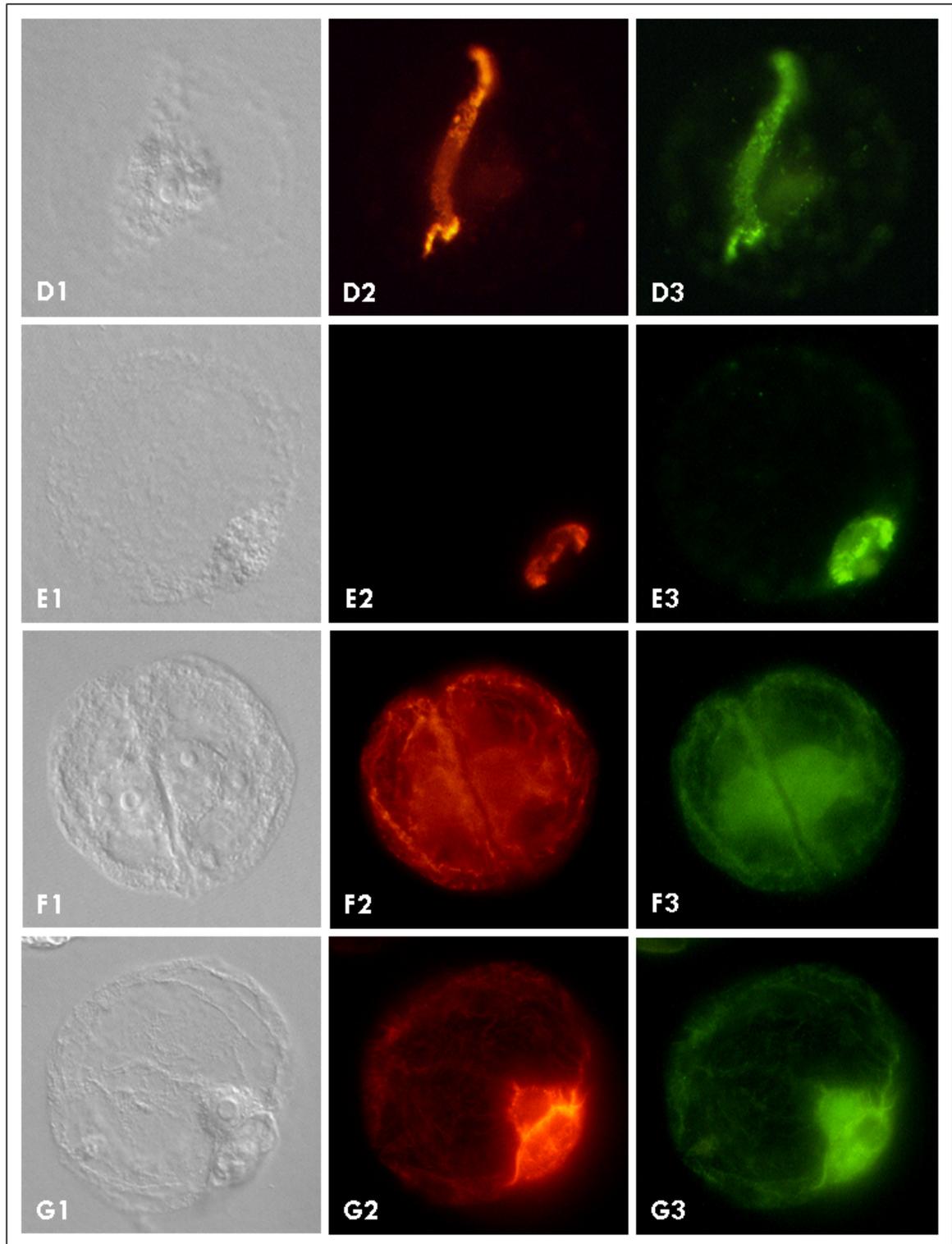
Lorsque la cellule entre en division, le marquage des composantes du cytosquelette et de la protéine HaWLIM-1 est très intense, souvent diffus, et localisé dans des zones limitées de la cellule. Ces caractéristiques rendent impossible la quantification de la colocalisation dans les cellules en division, sous peine d'obtenir des résultats non représentatifs.

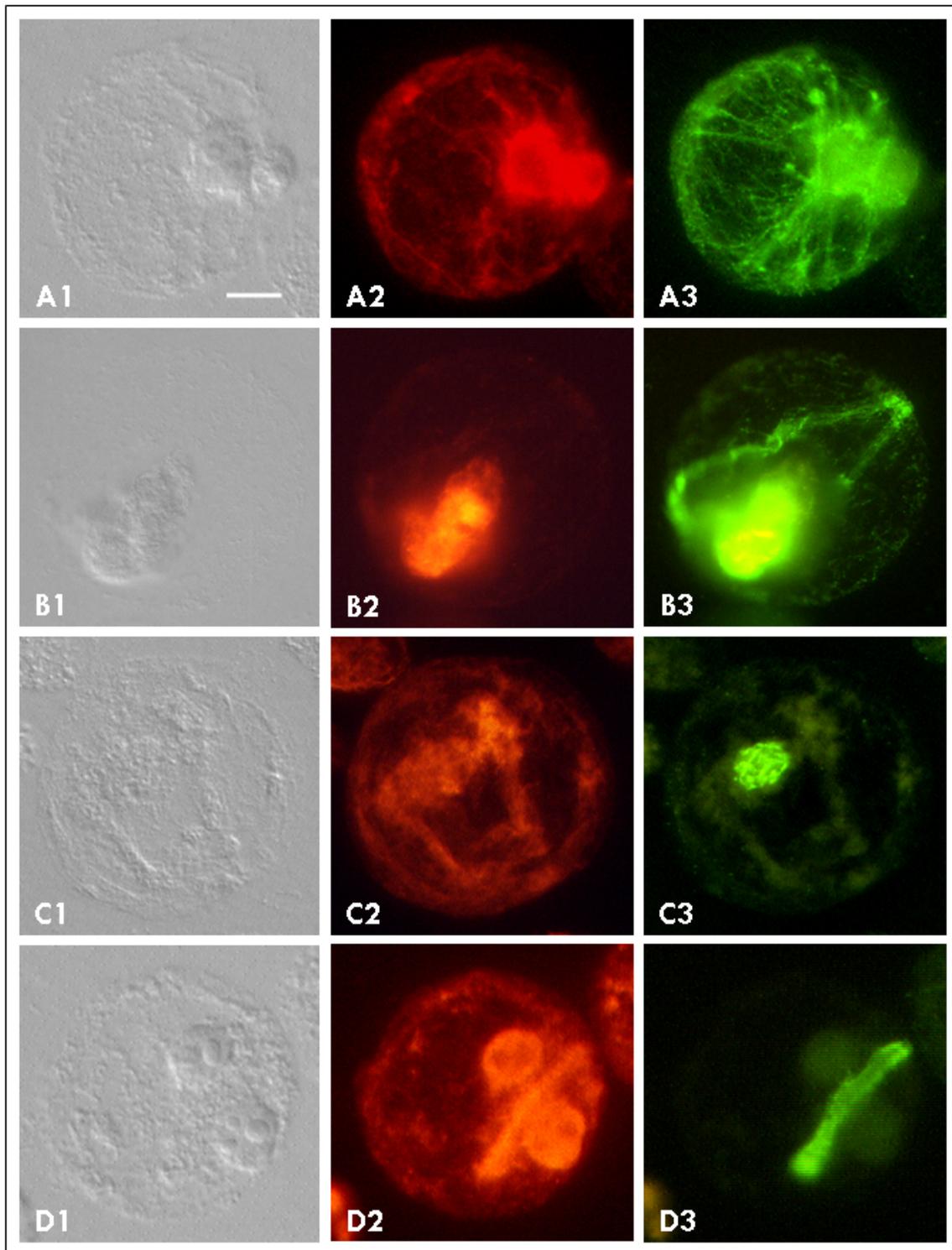
Les observations microscopiques révèlent néanmoins que la protéine HaWLIM-1 est associée aux microtubules pendant tous les stades de la division : elle est présente au niveau de la cage péri-nucléaire et au niveau de la bande pré-prophasique à la fin de l'interphase, au niveau du fuseau mitotique pendant la mitose, et au niveau du phragmoplaste pendant la cytokinèse (Fig. 39). Par contre, la protéine HaWLIM-1 n'est pas co-localisée avec les microfilaments d'actine, excepté lorsque ceux-ci présentent la même localisation que le réseau de microtubules, notamment au niveau du phragmoplaste (Fig. 40).



**Figure 39.** Double-marquage microtubules / protéine HaWVIM-1 au cours de la division des protoplastes.

Des protoplastes d'hypocotyles de tournesol sont fixés après 2, 4, 6 ou 8 jours de culture en milieu liquide ou en milieu agarosé. Ils sont ensuite marqués simultanément à l'aide d'anticorps anti-béta-tuline et d'anticorps anti-HaWVIM-1. On peut alors observer différents réseaux microtubulaires au cours de la division des protoplastes. **A.** Microtubules irradiants à partir de la surface nucléaire, **B.** Bande préprophasique, **C.** Fuseau mitotique, **D.** Phragmoplaste dans le cas d'une division symétrique, **E.** Phragmoplaste dans le cas d'une division asymétrique, **F.** Réseau microtubulaire après division symétrique, **G.** Réseau microtubulaire après division asymétrique. (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1) Images des protoplastes en contraste interférentiel; (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2) marquage des microtubules révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au Texas Red ; (A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3) marquage de la protéine HaWVIM-1 révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au FITC. (Barre = 10  $\mu$ M).





**Figure 40.** Double-marquage actine / protéine HaWLIM-1 au cours de la division des protoplastes. Des protoplastes d'hypocotyles de tournesol sont fixés après 2, 4, 6 ou 8 jours de culture en milieu liquide ou en milieu agarosé. Ils sont ensuite marqués simultanément à l'aide d'anticorps anti-actine et d'anticorps anti-HaWLIM-1. **A.** Marquage périnucléaire; **B.** Bande préprophasique; **C.** Fuseau mitotique; **D.** Phragmoplaste. (A1, B1, C1, D1) Images des protoplastes en contrast interférentiel; (A2, B2, C2, D2) marquage de l'actine révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au Texas Red ; (A3, B3, C3, D3) marquage de la protéine HaWLIM-1 révélé grâce à un anticorps secondaire couplé au FITC. (Barre = 10  $\mu$ M).

Ces observations apportent un argument supplémentaire pour une association étroite de la protéine HaWLIM-1 avec les microtubules.

## VI. DISCUSSION.

Afin de déterminer si la protéine HaWLIM-1 joue un rôle dans le contrôle de certaines étapes du développement chez le tournesol, en particulier lors de la dédifférenciation cellulaire, la différenciation cellulaire et/ ou la division cellulaire, nous avons suivi, par différentes approches, l'expression et la localisation de cette protéine au cours de la culture des protoplastes de tournesol.

Ces expériences révèlent que l'expression et la forme de la protéine HaWLIM-1 évoluent au cours du développement cellulaire. Il a ainsi été démontré par RT-PCR que le gène *HaWLIM-1* s'exprime constamment durant les huit premiers jours de la culture des protoplastes. Cette expression semble diminuer au cours du temps. Des expériences d'immunoblot utilisant des anticorps spécifiques de la protéine HaWLIM-1 indiquent que les polypeptides de 52 et 78 kDa, précédemment détectés dans les protoplastes fraîchement isolés, sont présents durant toute la durée de la culture. Ces expériences permettent également de mettre en évidence l'apparition de nouveaux polypeptides au fur et à mesure du développement. Un de ces polypeptides, dont la masse moléculaire est de 35 kDa, pourrait correspondre à la forme monomérique de la protéine HaWLIM-1. La reconnaissance de nouveaux polypeptides de masse moléculaire supérieure à 35 kDa (43 kDa et 64 kDa) par les anticorps anti-HaWLIM-1 semble indiquer que la protéine HaWLIM-1 possède la capacité de s'associer avec de nouveaux complexes protéiques au cours du développement. Le suivi de la localisation de la protéine HaWLIM-1 au cours de la culture des protoplastes révèle par ailleurs que cette protéine reste étroitement associée aux microtubules durant les différentes étapes de la division cellulaire.

### A. Implication de la protéine HaWLIM-1 dans la dé-différenciation et la différenciation cellulaire ?

Les protoplastes fraîchement isolés à partir des hypocotyles sont des cellules encore différenciées. La disparition de leur paroi, puis la mise en culture dans un milieu nutritif riche en auxines, vont induire la dé-différenciation de ces cellules, qui resteront dans cet état indifférencié durant toute la durée du processus de division cellulaire. Les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, lorsqu'ils sont cultivés en milieu liquide, se développent en microcolonies, des structures inorganisées et non polarisées, constituées de cellules indifférenciées. Dans ces conditions, ces protoplastes ne vont donc jamais se différencier. Le suivi de la culture des protoplastes en milieu liquide permet donc d'observer les événements intervenants au cours de la dédifférenciation cellulaire.

Les expériences préliminaires de RT-PCR comparatives présentées dans ce chapitre semblent indiquer, bien que ces observations restent à confirmer, que l'expression du gène HaWLIM-1 tend à diminuer au cours de la culture des protoplastes, c'est à dire au cours de la dé-différenciation de ces cellules. On peut ainsi supposer que la fonction de la protéine HaWLIM-1 perd de son importance dans les cellules indifférenciées.

Les résultats obtenus en immunoblot semblent indiquer que la protéine HaWLIM-1 possède la capacité de s'associer et de se dissocier avec de nouveaux complexes protéiques au cours du développement des protoplastes. Le polypeptide de 35 kDa apparaissant au cours de la culture des protoplastes pourrait correspondre à la forme monomérique de la protéine HaWLIM-1, comme cela a été suggéré par Mundel et collaborateurs (Mundel et al., 2000). Cette forme monomérique semble caractéristique des cellules indifférenciées. Une étude réalisée à partir d'ovaires de tournesol prélevés à différents stades de développement indique en effet que dans les ovaires immatures, la forme monomérique de 35 kDa est prédominante, tandis que dans les ovaires matures, seul le polypeptide de 52 kDa peut être observé (Mundel et al., 2000). Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées sur les protoplastes de tournesol, où la forme monomérique de la protéine HaWLIM-1 apparaît lorsque la culture de protoplastes est dans un état indifférencié.

Pourquoi n'observe-t-on la forme monomérique de la protéine HaWLIM-1 que dans les cellules indifférenciées ? On peut imaginer que la protéine HaWLIM-1, lorsqu'elle se présente sous forme monomérique, n'a pas de fonction particulière dans les cellules indifférenciées, ce qui serait compatible avec le fait que l'expression du gène *HaWLIM-1* diminue au fur et à mesure de la dé-différenciation cellulaire.

Il est possible que la protéine HaWLIM-1 ait plutôt un rôle à jouer au cours de la différenciation cellulaire. En effet, la plupart des protéines CRP animales, auxquelles les protéines LIM végétales sont assimilées, sont clairement impliquées dans le processus de différenciation cellulaire. D'une part, leur localisation intracellulaire évolue au cours de la différenciation. Par exemple, dans les cellules myogéniques, la protéine CRP-3/MLP est exclusivement localisée dans le noyau ; plus tard, dans les myotubes matures et dans les fibres musculaires, cette protéine est localisée dans le noyau et le cytoplasme (Arber et al., 1994). D'autre part, des expériences d'inhibition fonctionnelle confirment le rôle central de ces protéines dans la différenciation. Ainsi, la répression du gène *CRP-3/MLP* par la technique anti-sens conduit au blocage de la différenciation des cellules musculaires (Arber et al., 1994).

Les protoplastes d'hypocotyles de tournesol, lorsqu'ils sont cultivés en milieu solide, conduisent, au fur et mesure des divisions cellulaires, à la formation de structures multicellulaires organisées semblables aux embryons zygotiques. Ils suivent donc un processus de différenciation. Ces protoplastes peuvent donc constituer un bon modèle pour étudier l'implication de la protéine HaWLIM-1 dans la différenciation cellulaire. Cependant, les contraintes techniques entraînées par la présence d'agarose dans le milieu de suspension des protoplastes nous empêchent à l'heure actuelle d'étudier l'expression du gène HaWLIM-1 dans ces protoplastes.

## B. Implication de la protéine HaWLIM-1 dans la division cellulaire ?

Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur le rôle occupé par les protéines LIM lors de la division cellulaire. A notre connaissance, nous sommes les seuls à avoir suivi de façon systématique l'expression et la localisation de protéines LIM tout au long de ce processus. La présence importante de la protéine HaWLIM-1 au niveau des microtubules nous permet d'envisager un rôle pour ces protéines dans la régulation de la dynamique des microtubules au cours de la division cellulaire.

Lors de l'initiation de la division cellulaire, le cytosquelette microtubulaire est ré-organisé de façon drastique. Les longs microtubules interphasiques disparaissent pour faire place au fuseau mitotique. Les microtubules sont sujets à la plus grande instabilité durant cette période. Ces changements de comportement des microtubules sont principalement régulés par des protéines MAPs. Ces protéines peuvent, selon les cas, favoriser la stabilisation des microtubules, ou, au contraire, induire leur dépolymérisation. Certaines de ces protéines régulatrices peuvent être modifiées et régulées par des mécanismes de phosphorylation dépendant du développement. D'autres peuvent être spécifiquement synthétisées, ou dégradées, durant la progression du cycle cellulaire. A la suite de cette régulation, la dynamique des microtubules est modifiée de façon à générer un *turn-over* rapide des microtubules pendant la mitose, qui permet les multiples modifications intervenant au niveau du réseau de microtubules durant la division cellulaire.

La protéine HaWLIM-1 peut-elle avoir un rôle à jouer dans ce processus de régulation ? Nous avons démontré que la localisation de la protéine HaWLIM-1 est calquée sur celle des microtubules lors de la progression du cycle cellulaire : cette protéine est présente au niveau de la bande préprophasique à la fin de l'interphase, au niveau du fuseau mitotique pendant la mitose, et au niveau du phragmoplaste pendant la cytokinèse. La présence de la protéine HaWLIM-1 au niveau du phragmoplaste a également été observée dans les cellules d'ovaires, de tiges et de racines en division (Mundel *et al.*, 2000). La localisation de MAPs végétales au niveau de ces différentes structures microtubulaires a également été décrite à plusieurs reprises (Jiang et Sonobe, 1993 ; Tsui *et al.*, 1996). L'hypothèse selon laquelle la protéine HaWLIM-1 est une MAP semble donc renforcée par ces différentes constatations.

Les MAPs intervenant dans le contrôle de la dynamique des microtubules au cours du cycle cellulaire peuvent être régulées soit par des mécanismes de phosphorylations, soit par la modulation de leur synthèse ou de leur dégradation. Nous avons vu que le gène *HaWLIM-1* est exprimé durant les huit premiers jours de culture des protoplastes de tournesol. De plus, la protéine HaWLIM-1 peut être détectée par immunoblot pendant toute cette période. La présence de la protéine HaWLIM-1 est donc constante au cours du cycle cellulaire. Si on suppose que la protéine HaWLIM-1 est une MAP impliquée dans le contrôle de la conformation des microtubules pendant la division cellulaire, la régulation de l'activité de cette protéine ne peut pas s'effectuer par synthèse ou dégradation. On peut alors envisager un mécanisme de régulation par phosphorylation, en raison de la présence de sites potentiels de phosphorylation sur la séquence de la protéine.

Il ne faut cependant pas oublier qu'il existe certaines MAPs qui, même si elles sont constamment localisées sur les microtubules lors de la division cellulaire, n'ont aucun rôle à

jouer dans la régulation de la dynamique des microtubules. Il est donc envisageable que la protéine HaWLIM-1 soit également dans ce cas.

### **C. Conclusion.**

Les études présentées dans ce chapitre n'en sont encore qu'au stade préliminaire. Elles permettent de mettre en évidence les changements intervenant dans l'expression et la forme de la protéine HaWLIM-1 au cours du développement des protoplastes. La signification de ces changements au niveau cellulaire reste encore à élucider.

**CONCLUSION GENERALE  
ET  
PERSPECTIVES**

Les protéines LIM végétales sont à ce jour encore mal connues. D'une part, peu de ces protéines ont pu être identifiées et caractérisées. D'autre part, leur fonction au sein de la cellule végétale reste encore incertaine. Le tournesol est l'une des plantes chez lesquelles les connaissances sur les protéines LIM sont les plus avancées. Trois protéines LIM ont pu être identifiées chez cette plante : les protéines HaPLIM-1 (Baltz *et al.*, 1991) et HaPLIM-2 (Eliasson *et al.*, 2000) exprimées spécifiquement dans le pollen, et la protéine HaWLIM-1 (Mundel *et al.*, 2000) présente dans la plupart des organes de la plante. Ces protéines LIM de tournesol n'ont cependant à ce jour aucune fonction clairement identifiée.

L'analyse de l'expression des trois gènes LIM de tournesol précédemment cités et de la localisation des protéines correspondantes dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol nous ont permis de progresser dans la connaissance de la fonction de ces protéines dans les cellules végétales. On sait désormais que les protéines LIM végétales, comme leurs homologues animales, peuvent être présentes à la fois au niveau du noyau et au niveau du cytosquelette, et pourraient potentiellement jouer deux rôles distincts, en relation avec leur localisation, au sein de la cellule végétale. A notre connaissance, la protéine HaWLIM-1 constitue le premier exemple décrit à ce jour de protéine LIM (animales ou végétales) interagissant avec les microtubules. Cette observation, qui vient en complément des multiples descriptions d'interactions protéines LIM – actine dans les cellules animales, permet d'élargir le rôle des protéines LIM à l'ensemble des constituants du cytosquelette. Enfin, le suivi systématique du devenir de la protéine HaWLIM-1 au cours de la culture des protoplastes de tournesol nous a permis de mettre en évidence la présence de cette protéine tout au long des différentes étapes du cycle cellulaire.

L'ensemble de ces observations peut nous permettre de dégager de nouveaux objectifs de travail.

#### **A. Quelle est la fonction de la protéine HaWLIM-1 au niveau des microtubules ?**

L'étude par immunocytochimie de la localisation intracellulaire de la protéine HaWLIM-1 nous a permis de déterminer que cette protéine est étroitement associée aux microtubules. Cette association persiste même lors de remaniements importants du cytosquelette microtubulaire, comme lors du processus de dépolymérisation/repolymérisation des microtubules suite à un traitement par l'oryzaline, ou lors des différentes étapes du cycle cellulaire. La protéine HaWLIM-1 peut donc être considérée, pour une de ses fonctions, comme une protéine associée aux microtubules.

Afin de déterminer si l'association de la protéine HaWLIM-1 aux microtubules est fonctionnelle, il pourrait être intéressant d'inhiber le fonctionnement de la protéine HaWLIM-1. Plusieurs approches peuvent être envisagées. La première consiste à transformer, de façon stable ou transitoire, les protoplastes de tournesol à l'aide de la séquence du gène *HaWLIM-1* en orientation antisens, et d'observer les modifications entraînées par la répression de ce gène sur le cytosquelette des protoplastes. Un protocole d'expression transitoire dans les protoplastes d'hypocotyles de tournesol est en cours d'élaboration au laboratoire, et pourrait être utilisé dans cet objectif. La seconde méthode

consiste à essayer de bloquer l'action de la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes grâce à l'application d'anticorps spécifiques de cette protéine.

La protéine HaWLIM-1 peut-elle être considérée comme une nouvelle MAP végétale ? Pour pouvoir répondre à cette question, des expériences complémentaires doivent être réalisées. Il est en effet nécessaire de s'assurer que la protéine HaWLIM-1 (1) peut s'attacher de façon spécifique aux tubulines ; (2) est capable de stabiliser les microtubules et/ou de promouvoir l'assemblage des microtubules. Il existe des expériences *in vitro*, simples à mettre en œuvre, permettant de tester la capacité d'une protéine à induire la polymérisation de tubuline monomérique sous forme de microtubules. Cependant, ces expériences nécessitent d'avoir à disposition la protéine HaWLIM-1 sous forme purifiée. Elle ne pourront donc être menées que lorsqu'un protocole de purification efficace de la protéine HaWLIM-1 en conditions natives à partir de protoplastes de tournesol sera disponible (il est probable que la protéine recombinante surproduite dans *E. coli* ne soit pas fonctionnelle).

### **B. La protéine HaWLIM-1 est-elle impliquée dans les étapes précoces du développement ?**

Il est difficile à l'heure actuelle de définir de façon précise le rôle de la protéine HaWLIM-1 dans la dédifférenciation, la différenciation ou dans la division cellulaire. Les résultats présentés dans le chapitre 3 de ce mémoire, même s'ils sont encore très préliminaires, mettent cependant en avant une certaine évolution dans le « comportement » de la protéine HaWLIM-1 au cours de la culture des protoplastes : il semble y avoir une diminution dans l'expression du gène *HaWLIM-1*, et une modification dans la conformation de la protéine elle-même, comme le montrent les expériences d'immunoblot. La signification de ces changements au niveau cellulaire reste encore à élucider.

Afin de dégager un rôle pour la protéine HaWLIM-1 dans les premières étapes du développement chez le tournesol, plusieurs limitations techniques nécessitent d'être levées. Tout d'abord, la mise au point d'une méthode d'extraction d'acides nucléiques et de protéines à partir de protoplastes cultivés en milieu agarosé pourrait permettre d'étudier l'expression du gène *HaWLIM-1* et la forme de la protéine au cours de la différenciation cellulaire et au cours de l'embryogenèse, ce qui est impossible à réaliser à partir de protoplastes cultivés en milieu liquide, puisque ceux-ci restent dans un état indifférencié. Ensuite, l'optimisation de la technique de RT-PCR comparative permettrait de suivre, de façon plus précise que celle présentée dans ce mémoire, les variations apparaissant dans l'expression du gène *HaWLIM-1* au cours de la culture des protoplastes.

La présence de la protéine HaWLIM-1 au niveau nucléaire, ainsi que ses fortes homologies avec la protéine NtLIM-1, dont le rôle de facteur de transcription a été clairement démontré (Kawaoka *et al.*, 2000), suggèrent un rôle pour cette protéine au niveau de la régulation de la transcription de certains gènes. Dans les cellules animales, les gènes dont l'expression est régulée par les protéines LIM nucléaires sont impliqués dans les étapes précoces du développement animal (pour revue, se reporter au tableau 2 du Chapitre «Données Bibliographiques»). Il est possible que, de façon analogue aux protéines LIM

animales, les protéines LIM observées dans les noyaux des protoplastes interviennent dans la régulation de gènes impliqués dans la dédifférenciation cellulaire, la différenciation cellulaire, la division cellulaire ou l'embryogenèse. Là encore, la transformation de protoplastes par la séquence du gène HaWLIM-1 en orientation antisens pourrait permettre de savoir si les gènes dont l'expression est éventuellement régulée par les protéines LIM nucléaires sont effectivement impliqués dans les premières étapes du développement des plantes.

### **C. Quels sont les partenaires protéiques de la protéine HaWLIM-1 ?**

Les fonctions potentielles pouvant être attribuées à la protéine HaWLIM-1 dans les protoplastes semblent contradictoires. D'un côté, cette protéine est étroitement associée au microtubules, ce qui suggère une fonction proche de celle des MAPs. D'autre part, la protéine HaWLIM-1 s'accumule dans le noyau, et présente de très fortes homologues avec la protéine LIM de tabac NtLIM-1, dont le rôle en tant que facteur de transcription est désormais admis (Kawaoka *et al.*, 2000). Comment ces deux fonctions cellulaires très différentes peuvent elles être remplies par une même protéine ? Il est possible que la protéine HaWLIM-1 interagisse avec des partenaires protéiques différents selon sa localisation et selon le stade de développement de la plante. Les études réalisées sur les protéines LIM de type CRP montrent en effet que ces protéines s'associent à des protéines localisées aussi bien au niveau du cytosquelette ( $\alpha$ -actinine et zyxine) qu'au niveau nucléaire (Myo D). L'identification des partenaires protéiques de HaWLIM-1 représente un travail important, mais qu'il est nécessaire de développer dans un avenir proche.

Pour cela, plusieurs approches sont envisageables. La première de ces approches consiste en un criblage double-hybride d'une banque d'expression sur la capacité des protéines à se lier à la protéine HaWLIM-1. Aucune banque d'expression de protoplastes d'hypocotyles de tournesol n'est disponible à l'heure actuelle. Cependant, l'IBMP de Strasbourg possède une banque d'expression de pollen qui pourrait être utilisée dans un premier temps, la protéine HaWLIM-1 étant également exprimée dans le pollen. Une autre approche serait d'isoler les complexes contenant la protéine HaWLIM-1 soit par immunoprécipitation, soit par chromatographie par affinité, et de microséquencer les diverses protéines impliquées dans ces complexes. Cette approche permettrait non seulement d'identifier les protéines interagissant directement avec la protéine HaWLIM-1, mais également de caractériser les autres protéines impliquées dans les complexes.

### **D. Conclusion.**

L'élucidation de la fonction, au niveau cellulaire et moléculaire, de la protéine HaWLIM-1 et des autres protéines LIM végétales constitue un objectif majeur pour les années à venir. Ces investigations pourraient permettre d'apporter une contribution significative pour une meilleure compréhension de nombreux processus biologiques fondamentaux, non seulement chez les plantes, mais aussi chez les animaux.

## MATERIEL ET METHODES

La composition des différents tampons et milieux de culture est détaillée en Annexe n°2.

## MATERIEL

### I. MATERIEL VEGETAL.

#### A. Matériel végétal.

Les akènes de tournesol (*Helianthus annuus L.*), hybride EMIL, sont fournis par la société Pioneer France Maïs (Aussonne, France).

#### B. Semis des akènes de tournesol.

Les akènes sont lavés à l'eau courante afin d'éliminer le fongicide qui les recouvre. Ils sont ensuite stérilisés dans de l'hypochlorite de calcium à 5% pendant 20 minutes, puis rincés dans de l'eau distillée stérile. La germination s'effectue en pots Podor sur le milieu de Murashige et Skoog (Annexe 2-1). Les pots contenant les akènes sont placés en chambre climatisée à 25°C avec une photopériode de 16 heures de jour/ 8 heures de nuit (intensité lumineuse de 25  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

#### C. Préparation des protoplastes d'hypocotyles de tournesol.

Les protoplastes sont isolés selon le protocole de Chanabé et collaborateurs (Chanabé et al., 1989), à partir d'hypocotyles de plantes âgées de 8 jours.

Les hypocotyles sont découpés longitudinalement pour faciliter l'hydrolyse enzymatique. Ils sont incubés durant 1 h 30 dans du milieu S (Annexe 2-2), dont l'osmolarité est fixée à la valeur d'équilibre osmotique des protoplastes. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par 10 ml de milieu S contenant les cellulases et les pectinases (Cayla) nécessaires à la digestion de la paroi cellulaire. La nature des enzymes utilisées pour l'obtention des protoplastes d'hypocotyles de tournesol est détaillée dans le tableau suivant :

Enzyme	Dénomination	Origine	concentration finale
Cellulases	Caylase P	<i>Penicillium occitanis</i>	0.0225 %
	Caylase 345	<i>Trichoderma</i>	0.0525 %
Pectinases	Caylase M2	<i>Penicillium occitanis</i>	0.075 %

Après 14 heures d'incubation à 25°C et à l'obscurité, les protoplastes sont libérés par une agitation manuelle douce. La suspension de protoplastes est ensuite filtrée sur tamis métallique de maille 100  $\mu\text{M}$  afin d'éliminer la plus grande partie des débris végétaux. Les

protoplastes, récupérés après centrifugation (70 x g, 5 min), sont purifiés par flottaison sur gradient de Ficoll (Annexe 2-3) au cours d'une centrifugation (1000 x g, 20 min). Les protoplastes se trouvant à l'interface des deux milieux sont prélevés, puis lavés à deux reprises dans du milieu S. Une centrifugation finale (70 x g, 5 min) permet de récupérer les protoplastes sous la forme d'un culot.

La numération des protoplastes est effectuée à l'aide d'une cellule de Fushs–Rosenthal après dilution de la suspension au 1 : 20<sup>e</sup>. Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope inversé.

Un test de viabilité utilisant le di-acétate de fluorescéine (FDA) est réalisé avant la mise en culture de manière à estimer la qualité des protoplastes.

#### **D. Culture des protoplastes en milieu liquide.**

Les protoplastes sont ensemencés dans du milieu TLD (Annexe 2-4) à une concentration de 50 000 protoplastes / ml. La suspension de protoplastes ainsi obtenue est répartie dans des boîtes de Pétri de diamètre 55 mm (Nunclon) à raison de 2.5 ml de suspension par boîte.

#### **E. Culture des protoplastes après inclusion dans une maille d'agarose.**

La culture en milieu agarosé est effectuée suivant le protocole décrit par Chanabé et collaborateurs (*Chanabé et al., 1991*). Les protoplastes sont repris dans du milieu TLD à une concentration de 100 000 protoplastes / ml. Du milieu TLD concentré deux fois et de l'agarose Sea Plaque à 2 % dans de l'eau maintenu à 58°C (FMC Bioproduct, Rockland, USA) sont mélangés extemporanément à volume égal. Ce mélange TLD-agarose est ajouté à la suspension de protoplastes dans un rapport 1 : 1. Deux mises en culture différentes peuvent alors être envisagées.

##### ► Culture des protoplastes sous forme de gouttes.

Dans ce cas, 4 gouttes de 250 µl du mélange TLD-agarose-protoplastes sont rapidement coulées sur des boîtes de Pétri de 55 mm (Greiner) préalablement refroidies à – 20°C afin de faciliter la formation des gouttes. La concentration finale en protoplastes dans les gouttes d'agarose est de 50 000 protoplastes / ml. Après incubation à 4°C pendant une heure, les gouttes sont recouvertes de 2.5 ml de milieu TLD.

##### ► Culture des protoplastes sur lamelles.

Pour les études en microscopie à fluorescence ou en microscopie confocale, les protoplastes inclus dans l'agarose sont directement cultivés sur des lamelles. Les lamelles utilisées sont au préalable recouvertes d'une solution de Poly-L-lysine (Sigma) contenant 0.1 % de Triton X-100 réduit, séchées durant une heure, puis autoclavées pour fixer le produit. Pour réaliser la mise en culture, 40 µl du mélange TLD-agarose-protoplastes sont immédiatement étalés sous forme d'un film homogène sur des lamelles stériles 22 x 22 mm placées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Nunclon). La concentration finale en protoplastes sur les lamelles est de 50 000 protoplastes / ml. Après incubation à 4°C pendant une heure, les lamelles sont recouvertes par 1 ml de milieu TLD.

	Western blot	Immunocytologie
<b>Anticorps primaires.</b>		
Anti HaWLM-1	1 : 10 000°	1 : 7000°
Anti $\alpha$ tubuline	1 : 1000°	1 : 125°
Anti $\beta$ tubuline	1 : 100 000°	1 : 125°
Anti actine	1 : 1000°	1 : 100°
<b>Anticorps secondaires.</b>		
Anti lapin – HRP peroxydase	1 : 5000°	*
Anti souris – HRP peroxydase	1 : 5000°	*
Anti lapin – FITC	*	1 : 50°
Anti souris – FITC	*	1 : 50°
Anti souris – Texas Red	*	1 : 50e

**Tableau 5.** Concentrations utilisées pour les différents anticorps.

## **F. Conditions de culture des protoplastes.**

Les boîtes contenant les protoplastes sont scellées par du Parafilm. Elles sont ensuite placées à l'obscurité et à 25°C pendant 8 jours. Le pourcentage de protoplastes divisés est alors évalué sur trois des boîtes mises en culture. La numération est réalisée sur 100 protoplastes environ par boîte, soit 300 protoplastes au total.

## **II. PRODUITS SPECIFIQUES.**

### **A. Anticorps.**

Les concentrations utilisées pour les différents anticorps sont indiquées sur le tableau 5.

#### **► Anticorps primaires.**

Anticorps anti  $\alpha$  tubuline : anticorps monoclonal de souris (Sigma).

Anticorps anti  $\beta$  tubuline : anticorps monoclonal de souris (Amersham).

Anticorps anti actine : anticorps monoclonal de souris (Amersham).

Anticorps anti-HaWLIM-1 : ces anticorps nous ont été aimablement fournis par C. Mundel (IBMP-Strasbourg). Il s'agit d'un sérum polyclonal, obtenu chez le lapin par immunisation avec la protéine de fusion HaWLIM-1-GST purifiée. Les injections de la protéine ont été réalisées à des intervalles de 15 jours. Les anticorps utilisés lors des diverses expériences sont issus de sérum de lapin prélevé après la dixième injection.

#### **► Anticorps secondaires.**

La révélation des protéines étudiées repose sur l'utilisation de deux principes de détection différents, qui conditionnent le choix des anticorps secondaires : la chimioluminescence utilisée en Western blot nécessite l'utilisation d'un système enzymatique, alors que l'immunofluorescence nécessite la présence d'un fluorochrome.

Anticorps utilisés en Western blot :

Anticorps anti Ig G de lapin conjugué à la peroxydase HRP (Promega).

Anticorps anti Ig G de souris conjugué à la peroxydase HRP (Sigma).

Anticorps utilisés en immunofluorescence :

Anticorps anti Ig de souris conjugués à la fluorescéine (Amersham).

Anticorps anti Ig de lapin conjugués à la fluorescéine (Amersham).

Anticorps anti Ig G de souris conjugués au Texas Red (Immunotech).

## B. Autres produits.

### ► Oryzaline.

L'oryzaline est un herbicide sélectif de pré-émergence provoquant la déstructuration complète des microtubules des cellules végétales (Cleary et Hardham, 1990). Une solution mère d'oryzaline (Dow Elanco - Indianapolis - USA) à 1 mM est préparée par dilution dans de l'éthanol absolu, puis conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

### ► Latrunculine.

Une solution de latrunculine B (Calbiochem) à 1 mM est préparée par dilution dans du DMSO, puis conservée à - 80°C jusqu'à utilisation.

### ► Tubuline.

La tubuline utilisée pour les expérimentations correspond à un mélange d' $\alpha$  tubuline bovine et de  $\beta$  tubuline bovine (Tebu). Ce mélange est conservé à - 80°C jusqu'à utilisation.

## METHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES.

### I. METHODES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

#### A. Quantification et estimation de la qualité des acides nucléiques par spectrophotométrie.

La ligne de base du spectrophotomètre est effectuée avec 500  $\mu$ l d'eau UHQ stérile. L'échantillon d'ADN ou d'ARN est ensuite dilué directement dans cette solution de référence, afin d'estimer au mieux la concentration en acides nucléiques. Les mesures sont effectuées à 230 nm, 260 nm et 280 nm, et le spectre d'absorption des acides nucléiques entre 220 nm et 300 nm est tracé.

A 260 nm, une unité d'absorbance correspond à 50  $\mu$ g d'ADN double-brin ou à 40  $\mu$ g d'ARN par ml. Les spectres d'absorption des acides nucléiques présentent un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum d'absorption à 230 nm. La détermination des rapports  $DO_{260nm} / DO_{230nm}$  et  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$  permet de détecter la présence d'impuretés dans la préparation. Le rapport  $DO_{260nm} / DO_{230nm}$  permet d'estimer la présence de contaminants glucidiques. Il est supérieur à 2 pour des préparations de bonne qualité. Le rapport  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$  indique quant à lui la présence de protéines

résiduelles. Dans le cas d'une solution d'acides nucléiques de bonne qualité, ce ratio est compris entre 1.7 et 2, et il est égal à 2 pour une solution d'acides nucléiques pure.

## **B. Electrophorèse des acides nucléiques.**

### ► **Electrophorèse de l'ADN.**

L'ADN à analyser est additionné de tampon de charge (Annexe 2-5) et déposé sur un gel d'agarose à 0.8 % dans le tampon TBE (Annexe 2-6). La taille des molécules d'ADN est déterminée en comparant leur distance de migration avec celle du marqueur de taille 0.5 - 1 kb (BioLabs).

### ► **Electrophorèse de l'ARN.**

L'électrophorèse des ARN doit s'effectuer dans un environnement dépourvu de RNAses. Toutes les solutions et tout le matériel (tubes eppendorfs, embouts de pipettes...) qui doivent entrer en contact avec les ARN sont préalablement autoclavés. La cuve d'électrophorèse, ainsi que le peigne et la cassette utilisés pour couler le gel d'agarose, sont nettoyés à l'aide de détergent et d'alcool, traités pendant 10 min avec une solution d'eau oxygénée 3%, et enfin rincés abondamment à l'eau UHQ stérile. L'échantillon d'ARN à analyser doit contenir au minimum 1 µg d'ARN. Il est ensuite additionné de tampon de charge et déposé sur un gel d'agarose à 1 % dans le tampon TBE dilué à la concentration 0.5x et préparé en conditions stériles. La taille des molécules d'ARN est déterminée en comparant leur distance de migration avec celle du marqueur de taille 0.2 - 10 kb (Sigma).

Le gel d'agarose est placé dans une cuve entre deux électrodes soumises à une différence de potentiel constante de 80 V. Une fois la séparation électrophorétique achevée, les molécules d'ADN ou d'ARN sont révélées en trempant le gel 20 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET), puis en le plaçant sur une table à rayonnement ultraviolet.

## **II. EXTRACTION D'ARN A PARTIR DE PROTOPLASTES D'HYPOCOTYLES DE TOURNESOL.**

L'efficacité de différents protocoles d'extraction d'ARN a été déterminée sur les protoplastes d'hypocotyles de tournesol. Au préalable, il a été nécessaire d'adapter ces protocoles au matériel végétal particulier que constituent les protoplastes.

L'obtention de protoplastes étant particulièrement délicate, les volumes réactionnels ont été réduits de façon à utiliser moins de matériel végétal pour les extractions. Cette réduction a entraîné une diminution des vitesses de centrifugation (qui sont toujours inférieures à 13 000 x g) pour éviter que les culots d'ARN obtenus soient trop compactés et difficiles à remettre en suspension. Les protoplastes étant particulièrement fragiles, une congélation dans l'azote liquide suffit pour les faire éclater. Ainsi, pour obtenir un broyat à partir de ce type de matériel végétal, il suffit simplement de congeler les protoplastes dans de l'azote liquide, puis de les décongeler dans le tampon d'extraction. La décongélation des protoplastes s'effectue dans le tampon d'extraction afin d'inactiver immédiatement les RNAses présentes dans les cellules végétales.

### **A. Création d'un environnement dépourvu de RNAses.**

Pour obtenir une bonne préparation d'ARN, il est nécessaire de minimiser l'activité des RNAses. Le matériel utilisé doit être dans la mesure du possible à usage unique (embouts de micro-pipettes, pipettes plastiques, tubes eppendorfs...). La verrerie est traitée au di-éthyl-pyrocarbonate (DEPC) à 0.1% pendant 2 heures au minimum à température ambiante, puis rincée à l'eau stérile. Le matériel en métal (spatules...) est plongé dans l'alcool et enflammé. L'ensemble de ce matériel est autoclavé avant utilisation. L'eau, les tampons et les solutions utilisés pour les extractions sont préparés en conditions stériles, et, si leur composition le permet, traités au DEPC et autoclavés. L'ensemble des manipulations s'effectue à 4°C afin de réduire l'activité des RNAses libérées pendant la lyse des cellules.

### **B. Préparation des protoplastes cultivés en milieu liquide pour les extractions d'ARN.**

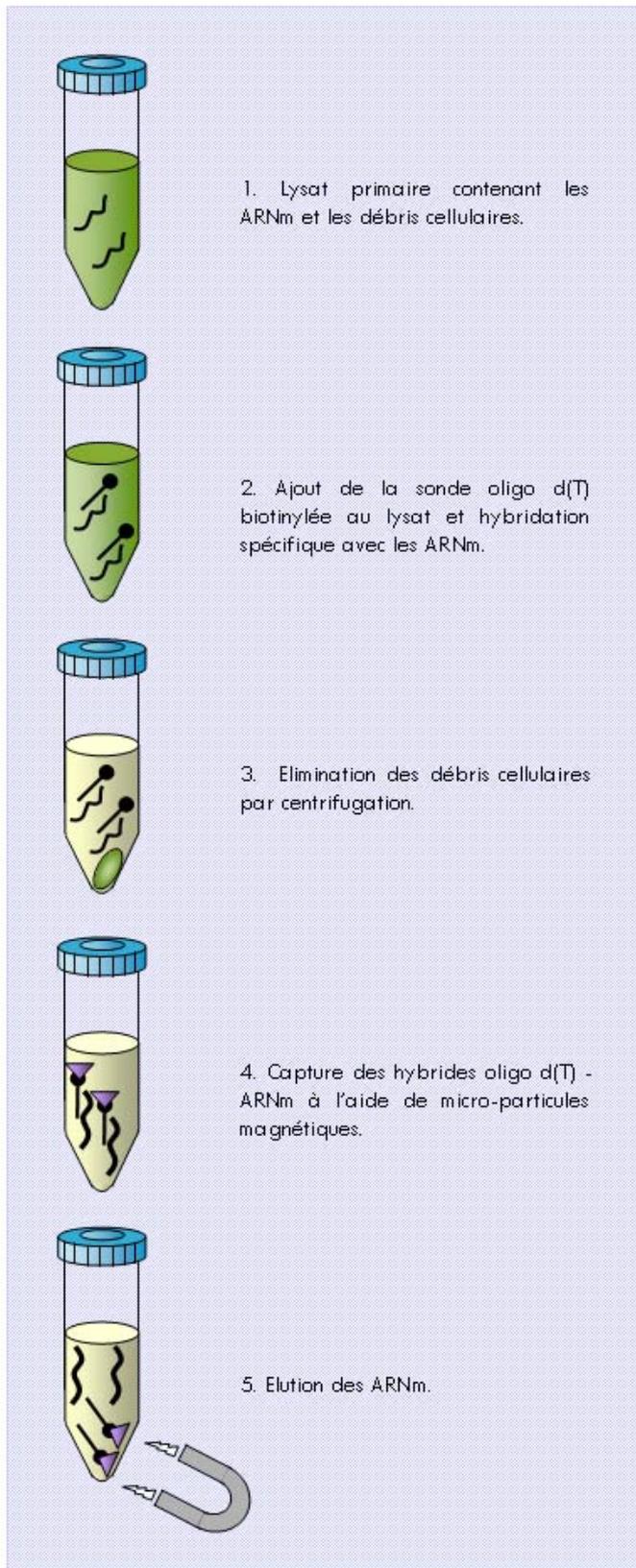
Les protoplastes en culture dans du milieu TLD sont transférés dans un tube à centrifuger conique en verre de 50 ml, à raison de 10 ml de suspension par tube. Le volume est complété à 50 ml à l'aide de milieu S. Après centrifugation (70 x g, 6 min), le culot de protoplastes est prélevé et transféré dans un tube eppendorf préalablement pesé. Le milieu S résiduel est éliminé par une centrifugation rapide (micro-centrifugeuse, 1 min). Après détermination par pesée de la quantité de matériel végétal ainsi obtenue, les protoplastes sont congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à - 80°C jusqu'à utilisation.

### **C. Extraction des ARN.**

#### **► Extraction des ARNm à l'aide du kit « PolyAtract System 1000 » (Promega).**

Ce kit permet d'isoler directement les ARNm, sans passer par une étape de purification des ARN totaux. Ce système est basé sur l'utilisation de micro-particules magnétiques couplées à la streptavidine, associées à une sonde oligo d(T) biotinylée, qui permettent de purifier sélectivement les ARN poly (A) + (Fig. 41). Le protocole utilisé est le protocole recommandé par le fournisseur pour les cellules en culture.

L'extraction des ARN s'effectue à partir de 50 à 100 mg de matériel végétal, soit environ  $3 \cdot 10^6$  protoplastes. Les protoplastes congelés sont vortexés à vitesse élevée pendant quelques minutes en présence de tampon d'extraction (Annexe 2-7). La sonde oligo d(T) biotinylée est ensuite ajoutée au lysat. Une incubation de 5 min à 70°C permet l'hybridation des séquences poly (A) + avec la sonde oligo d(T). Une étape de centrifugation (12 000 x g, 10 min, 4°C) permet d'éliminer les débris cellulaires et de précipiter les protéines. Les hybrides oligo d(T)-ARNm sont capturés à l'aide des micro-particules magnétiques : ils se fixent sur les microparticules par l'intermédiaire de la partie biotinylée, puis les microparticules sont récupérées grâce à l'utilisation d'un portoir aimanté. Les particules sont lavées à plusieurs reprises dans du tampon SSC (Annexe 2-8), puis les ARNm sont élués par l'ajout de 100 µl d'eau stérile. La qualité et la quantité des ARNm obtenus sont déterminées par spectrophotométrie.



**Figure 41.** Principe du protocole d'extraction des ARNm à l'aide du kit « PolyA Tract System ».

► **Méthode d'extraction des ARN au chlorure de lithium.**

L'extraction des ARN est effectuée suivant un protocole adapté de la méthode décrite par De Vries et collaborateurs (*De Vries et al., 1988*), à partir de 100 à 200 mg de matériel végétal, soit environ  $5 \cdot 10^6$  protoplastes. Les protoplastes congelés sont vortexés à vitesse élevée pendant quelques minutes en présence de tampon d'extraction (Annexe 2-9). Après une extraction au phénol / chloroforme (1 : 1), la phase aqueuse est isolée par centrifugation (4°C, 13 000 x g, 15 min) et les acides nucléiques qu'elle contient sont précipités toute la nuit à - 20°C par l'ajout de 1 / 3 de volume de chlorure de lithium 8 M. Après centrifugation (4°C, 13 000 x g, 30 min), les ARN sont précipités par l'ajout de chlorure de lithium 2 M. La solution est centrifugée (4°C, 13 000 x g, 10 min), puis le culot d'ARN est lavé deux fois à l'éthanol 70%, séché quelques minutes sous une hotte aspirante et repris dans 100 µl d'eau stérile. La qualité et la quantité des ARN obtenus sont déterminées par spectrophotométrie.

► **Méthode d'extraction des ARN à l'hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB).**

L'extraction des ARN s'effectue à partir de 100 à 200 mg de matériel végétal, soit environ  $5 \cdot 10^6$  protoplastes. Les protoplastes congelés sont vortexés à vitesse élevée pendant quelques minutes en présence de 750 µl de tampon d'extraction CTAB (Annexe 2-10). Après une extraction au phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25 : 24 : 1), la phase aqueuse est isolée par centrifugation (4°C, 13 000 x g, 15 min) et les acides nucléiques qu'elle contient sont précipités toute la nuit par l'ajout de 2 volumes d'isopropanol absolu. Après centrifugation (4°C, 13 000 x g, 20 min), le culot d'acides nucléiques est lavé deux fois à l'éthanol 70%, séché quelques minutes sous une hotte aspirante et repris dans 100 µl d'eau stérile. La qualité et la quantité des ARN obtenus sont déterminées par spectrophotométrie.

► **Méthode d'extraction des ARN à l'isothiocyanate de guanidium.**

L'extraction des ARN est effectuée suivant un protocole adapté de la méthode décrite par Shepherd et collaborateurs (*Shepherd et al., 1983*), à partir de 100 à 200 mg de matériel végétal, soit environ  $5 \cdot 10^6$  protoplastes. Les protoplastes congelés sont vortexés à vitesse élevée pendant quelques minutes en présence de 500 µl de tampon d'extraction (Annexe 2-11). Après deux extraction au phénol / chloroforme (1 : 1), la phase aqueuse est isolée par centrifugation (4°C, 9000 x g, 10 min) et les acides nucléiques qu'elle contient sont précipités toute la nuit par l'ajout d'acide acétique 1M et d'éthanol absolu (1 v : 7 v). Après centrifugation (4°C, 9000 x g, 20 min), les ARN sont précipités spécifiquement par l'ajout de chlorure de lithium 2 M. Après une nouvelle centrifugation (4°C, 9000 x g, 10 min), le culot d'ARN est repris dans de l'acétate de sodium 3M. La précipitation des ARN s'effectue à - 20°C pendant 2 h. Les ARN sont ensuite lavés à l'éthanol 70%, le culot obtenu est séché quelques minutes sous une hotte aspirante et repris dans 50 µl d'eau stérile. La qualité et la quantité des ARN obtenus sont déterminées par spectrophotométrie.

#### **D. Elimination de l'ADN contaminant par un traitement à la DNase.**

Le traitement utilise l'enzyme « DNase RNase free RQ1 » (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Les volumes réactionnels sont doublés par rapport au protocole original afin de faciliter les lavages au phénol / chloroforme effectués pour éliminer la DNase à la fin du traitement.

Les ARN sont mis en présence de tampon de réaction (Annexe 2-12) et de DNase. La dégradation de l'ADN s'effectue à 37°C pendant 30 minutes. La DNase est inactivée par l'ajout de solution stop (Annexe 2-13) et par une incubation de 10 minutes à 65°C. L'enzyme est ensuite éliminée par une extraction au phénol / chloroforme (1 :1). Les ARN sont repris dans de l'éthanol absolu. La précipitation des ARN s'effectue à - 20°C pendant 2 h. Après centrifugation (4°C, 9000 x g, 10 min), le culot obtenu est séché quelques minutes sous une hotte aspirante et repris dans 50 µl d'eau stérile. La qualité et la quantité des ARN obtenus sont déterminées par spectrophotométrie.

### **III. DETERMINATION PAR RT-PCR DE L'EXPRESSION DES GENES LIM DANS LES PROTOPLASTES DE TOURNESOL.**

#### **A. Transcription inverse.**

La synthèse des premiers brins d'ADNc à partir des ARN totaux de protoplastes de tournesol est effectuée à l'aide du kit « Advantage RT for PCR » (Clontech), suivant les recommandations du fournisseur. La stratégie utilisant les amorces oligo d(T), de préférence aux amorces hexamériques de séquences aléatoires, a été retenue.

La solution d'ARN est diluée de façon à obtenir 0.2 à 1 µg d'ARN dans 12.5 µl d'eau stérile. L'hybridation avec l'amorce oligo d(T) (20 pmol) s'effectue à 70°C pendant 2 minutes. La solution est ensuite additionnée de tampon de réaction (Annexe 2-14), de dNTP (0.5 mM de chaque), d'inhibiteur de RNase (1 unit / µl), et de reverse transcriptase (200 unités / µg d'ARN). Une incubation à 42°C pendant 1 heure permet l'élongation des premiers brins d'ADNc. La réaction est arrêtée par une incubation de 5 minutes à 95°C. L'ADNc obtenu est repris dans 80 µl d'eau stérile, puis conservé à - 80°C. Il peut ensuite être utilisé comme matrice pour les réactions d'amplification par PCR. L'efficacité de la synthèse des premiers brins d'ADNc est estimée en utilisant en parallèle l'ARN contrôle du kit (ARN totaux de placenta humain), associé au couple d'amorces PCR spécifique de l'enzyme G3PDH.

<b>pLIM-1 434 006 / 434 007</b>	5'	GAA ACT TCA TCA TAT CGA GCT ATT A	3'
	5'	ATG AAA TCA TTC ACA GGA ACA ACC	3'
<b>pLIM-2 421 638 / 421 639</b>	5'	TGA TTG TTG GTT CTG CCC AAC TA	3'
	5'	CAA TGA CAT ACA ACA GTT GTA TAG ACA	3'
<b>wLIM 450 386 / wLIM 450387</b>	5'	TCA AGG TGC GGT TTC TCC GAC CCT TGC AGA ACG CT	3'
	5'	ATG GCA TTT GCA GGC ACT ACC CAG AAA TGC ATG GC	3'
<b>wLIM 2708 / wLIM 2030</b>	5'	GCG GCC GCT TTT TTG GAA GC	3'
	5'	GGA TCT GAA TTC GTT GCA GGC ACT ACC CAG	3'

**Tableau 6.** Séquences des amorces spécifiques des gènes LIM de tournesol.

La localisation de ces différents couples d'amorces sur la séquence nucléique du gène correspondant est indiquée en Annexe n° 1.

## B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Les amorces utilisées pour étudier les gènes *HaPLIM-1*, *HaPLIM-2* et *HaWLIM-1* dans les protoplastes sont répertoriées dans le tableau 6. L'amplification est réalisée à partir de 10 µl de la solution d'ADNc obtenue après transcription inverse. Chaque réaction d'amplification, dont le volume réactionnel est de 50 µl, comprend en outre les éléments suivants, aux concentrations indiquées :

<b>dATP, dCTP, dGTP, dTTP</b>		0.5 mM de chaque
<b>Tampon PCR</b>	Tris-HCl pH 8.4	200 mM
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
<b>Amorces</b>		2 µM de chaque
<b>ADN polymérase</b>		2.5 unités

Toutes les réactions de PCR sont effectuées en utilisant l'ADN Taq polymérase (Gibco BRL). Après une dénaturation initiale (95°C, 5 min) suivent 35 cycles d'amplification (95°C, 1 min ; 50°C, 1 min ; 72°C, 2 min) puis une étape d'élongation finale de 15 min à 72°C (thermocycleur Perkin Elmer - Applied Biosystem). Les produits PCR obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

## C. RT-PCR comparative.

La RT-PCR comparative, ou semi-quantitative, consiste à réaliser une amplification à l'aide d'amorces spécifiques du gène étudié, et d'amorces spécifiques d'un témoin interne d'expression constitutive, à partir de quantité d'ADNc identiques, afin de pouvoir par la suite comparer l'intensité des signaux obtenus.

Le protocole suivi pour la RT-PCR comparative est identique à la procédure décrite pour la PCR classique. Dans le cas d'une amplification simultanée avec deux couples d'amorces différents, les amorces spécifiques du témoin interne sont ajoutées après 8 cycles d'amplification afin d'éviter les éventuelles interférences entre les deux couples d'amorces.

Après séparation électrophorétique des différents produits d'amplifications obtenus et révélation au BET, une image numérique du gel est réalisée. Le traitement et l'analyse de cette image sont effectués à l'aide du logiciel Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Après soustraction du fond, l'intensité du marquage de chaque bande est mesurée. Le niveau relatif d'expression du gène *HaWLIM-1* est représenté par le rapport :

$$\text{Niveau d'expression} = \frac{\text{Intensité du marquage de la bande correspondant à HaWLIM-1}}{\text{Intensité du marquage de la bande correspondant au témoin}}$$

#### **IV. SEQUENÇAGE DE L'ADN ET ANALYSE DES SEQUENCES.**

##### **A. Séquençage.**

Les fragments PCR ont été confiés à la société Génome Express (Grenoble) pour séquençage suivant la méthode de terminaison de chaîne par désoxynucléotides.

##### **B. Analyse des séquences.**

Les comparaisons de séquences sont réalisées à l'aide du programme « Align », disponible sur le serveur du National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ou à l'aide du programme « Clustalw1 » disponible sur le serveur d'Infobiogen ([www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr)).

### **METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.**

#### **I. OBTENTION DE PROTEINES DE PROTOPLASTES.**

##### **A. Préparation des protoplastes cultivés en milieu liquide pour l'extraction de protéines totales.**

Après l'isolement ou la culture des protoplastes, la suspension de protoplastes est transférée dans un tube à centrifuger conique en verre de 50 ml, à raison de 10 ml par tube. Le volume est complété à 50 ml à l'aide de milieu S. Après centrifugation (70 x g, 6 min), le culot de protoplastes est prélevé, puis dilué dans du milieu S de façon à obtenir une concentration finale de 6 000 000 protoplastes / ml. La suspension est ensuite répartie dans des tubes eppendorfs, à raison de 500 µl par tube, puis on y ajoute 500 µl de tampon de Laemmli (Annexe 2-15), avant congélation dans de l'azote liquide, puis conservation à - 80°C jusqu'à utilisation.

##### **B. Isolement de noyaux de protoplastes pour l'extraction de protéines nucléaires.**

Les noyaux sont extraits suivant un protocole dérivant de la méthode décrite par Stoppin et collaborateurs (Stoppin et al., 1994). Après isolement des protoplastes, la suspension de protoplastes est transférée dans un tube à hémolyse en verre. Le milieu de culture résiduel est éliminé par centrifugation (50 x g, 5 min). Afin de lyser les membranes cellulaires, les

protoplastes sont incubés dans du tampon de lyse (Annexe 2-16) pendant 20 min à 25°C et sous agitation douce. La suspension de noyaux ainsi obtenue est filtrée à travers une toile de nylon de maille 30 µm. Les noyaux sont précipités par centrifugation (80 x g, 10 min, 4°C), puis repris dans du milieu noyaux (Annexe 2-17). La qualité de la suspension de noyaux est estimée par observation microscopique après coloration au 4.6 di-amino 2 phenyl indol (DAPI). La suspension de noyaux est ensuite répartie dans des tubes eppendorfs, à raison de 500 µl par tube, puis on y ajoute 500 µl de tampon de Laemmli, avant congélation dans de l'azote liquide, puis conservation à - 80°C jusqu'à utilisation.

### **C. Extraction des protéines de protoplastes.**

L'ensemble des étapes de l'extraction s'effectue à 4°C. Les protoplastes ou les noyaux isolés sont décongelés en présence de polyvinylpyrrolidone (PVPP) à 2 % et de β mercaptoéthanol à 4 %, afin de chélater les phénols et d'inhiber les protéases libérées lors de la lyse des protoplastes. La lyse des membranes est effectuée par sonication (10 impulsions de 1 secondes puissance 5 – sonicateur Vibra Cell Bioblock Scientific). Les débris cellulaires et le PVPP sont éliminés par centrifugation (15 000 x g, 15 min, 4°C). Le surnageant est prélevé, puis mélangé à de l'acétone à 80 % préalablement refroidit à - 20°C (1 : 3). Après 20 minutes d'incubation à - 20°C, les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation (13 000 x g, 10 min, 4°C). Trois lavages à l'acétone glaciale sont nécessaires pour éliminer les chlorophylles de l'échantillon protéique. Les échantillons sont ensuite séchés à l'air, puis dosés selon la méthode de Bradford.

## **II. METHODES GENERALES DE BIOCHIMIE.**

### **A. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford.**

Les protéines sont dosées selon la méthode décrite par Bradford (*Bradford, 1976*). Les protéines sont solubilisées dans une solution de NaOH 0.1 M, puis placées pendant 5 minutes dans un bain-marie à 100°C afin de les dénaturer. Un mélange composé de 20 µl de la solution protéique, 780 µl d'eau distillée et de 200 µl du réactif nécessaire au dosage (Biorad Protein Assay) est réalisé. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, la densité optique de l'échantillon est déterminée à 595 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est estimée par comparaison avec une courbe de référence réalisée à l'aide d'albumine sérique bovine (BSA).

### **B. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes.**

Les électrophorèses des protéines sont effectuées en gel de polyacrylamide selon une méthode dérivée de celle décrite par Laemmli (*Laemmli, 1970*). Un gel de séparation à 12 % en acrylamide (Annexe 2-18), puis un gel de concentration à 4 % en acrylamide (Annexe 2-19), sont coulés successivement entre deux plaques 9 x 6.5 x 0.75 cm d'une cuve Biorad. Les extraits protéiques sont additionnés de tampon de charge (Annexe 2-20), puis chauffés 5 minutes à 95°C afin de dénaturer les protéines. La migration est effectuée à

température ambiante sous intensité constante de 80 V dans le gel de concentration et 120 V dans le gel de séparation.

### **C. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.**

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous l'effet d'un champ électrique.

La membrane de nitrocellulose (membrane Hybond C-extra, Amersham) est plongée dans une solution de transfert (Annexe 2-22), puis mise en contact avec le gel d'acrylamide comportant les protéines. L'ensemble est disposé entre plusieurs feuilles de papier Wattman généreusement imbibé de la solution de transfert. L'électrotransfert est réalisé sous intensité constante (125 mA) pendant 1 h 15 dans un appareil de transfert (appareil semi-sec, Millipore).

La qualité du transfert est vérifiée par une coloration de la membrane au rouge Ponceau. La membrane est ensuite décolorée par rinçages successifs dans l'eau. Elle peut être conservée sèche ou dans une solution de TBS (Annexe 2-23) jusqu'à la réalisation de l'immunodétection.

### **D. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.**

Dans le cas où les protéines ne sont pas transférées sur membrane de nitrocellulose, les protéines peuvent être visualisées directement sur le gel par l'utilisation du bleu de Coomassie (R250-Biorad), un colorant qui permet de révéler des quantités de protéines de l'ordre du µg.

Le gel d'acrylamide est plongé durant 30 minutes dans une solution de bleu de Coomassie (Annexe 2-24). L'excès de colorant est éliminé progressivement par une solution décolorante (2-25).

### **E. Western blot.**

Suite à leur transfert sur membrane de nitrocellulose, plusieurs étapes sont effectuées afin de détecter les protéines d'intérêt. Tout d'abord, les sites non spécifiques sont saturés en incubant la membrane dans une solution de TBS-lait 10% (Annexe 2-26) pendant 2 h à température ambiante. Les anticorps primaires sont ensuite appliqués à la concentration désirée (se reporter au tableau 5) dans du tampon TBS-lait 1% pendant 1 h 30. Après 3 lavages de 10 minutes dans du tampon TBS-lait 1 %, la membrane est mise en présence des anticorps secondaires pendant une heure, puis rincée à l'aide du tampon TBS-lait 1 %.

La révélation des protéines reconnues par les anticorps primaires s'effectue par la technique ECL. Cette technique est basée sur une réaction de chimioluminescence, catalysée par la peroxydase couplée aux anticorps secondaires. Lorsque cette enzyme est mise en présence de son substrat, le peroxyde d'hydrogène, elle est en effet capable de transformer le 4-chloro-1-naphtol en luminol, un composé émettant un signal lumineux pouvant être détecté par impression sur un film photographique.

La révélation utilisant le kit ECL (Amersham) s'effectue à l'obscurité en quelques minutes. Les deux réactifs du kit (peroxyde d'hydrogène et 4-chloro-1-naphtol) sont mélangés volume à volume, puis incubés 1 minute sur la membrane portant les protéines à détecter. L'excès de

réactif est éliminé, puis la membrane est placée dans une cassette de révélation en contact avec un film photographique (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film – Boehringer Mannheim). Le film est développé immédiatement après l'exposition.

#### F. Calcul des masses moléculaires des protéines détectées en Western blot.

La masse moléculaire des différents polypeptides est déterminée, après leur coloration, par référence à des protéines étalons (Biorad) : la  $\beta$  galactosidase (116.25 kDa), la phosphorylase b (97.4 kDa), la BSA (66.2 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique (31 kDa), l'inhibiteur de trypsine de soja (21.5 kDa), la lysozyme (14.5 kDa), et l'aprotinine (6.5 kDa).

La mobilité relative (Rf) des protéines (protéines étalons et protéines d'intérêt) est déterminée grâce à la relation suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance de migration des protéines (dp)}}{\text{Distance de migration totale du marqueur coloré (dd)}}$$

La courbe  $\log PM = f(\log Rf)$ , tracées à l'aide des valeurs obtenues pour les protéines étalons, permet de calculer les masses moléculaires des protéines étudiées.

### III. PURIFICATION DES ANTICORPS ANTI HaWLIM-1 PAR AFFINITE.

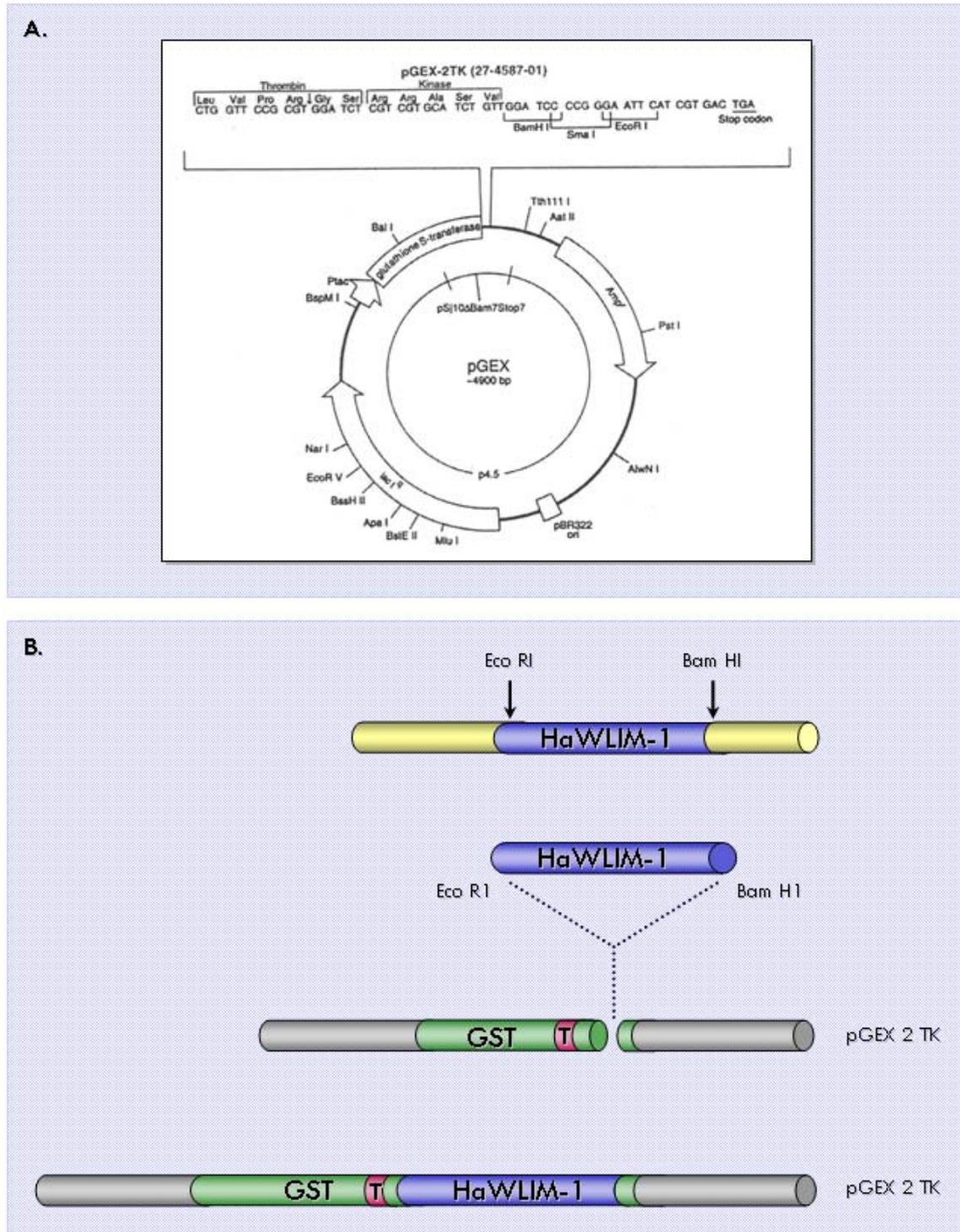
#### A. Surexpression de la protéine HaWLIM-1 chez *Escherichia coli*.

La souche bactérienne d'*E. coli* BL-21 sur-exprimant la protéine HaWLIM-1 nous a été aimablement fournie par C. Mundel (IBMP-Strasbourg).

Le vecteur d'expression utilisé pour la construction est le vecteur pGEX 2 TK (Fig. 42-A). Il permet la production d'une protéine de fusion composée de la glutathion-S-transférase (GST) de *Schistosoma japonicum* couplée à la protéine étudiée. La présence de la GST permet une purification rapide et efficace dans des conditions non dénaturantes de la protéine d'intérêt.

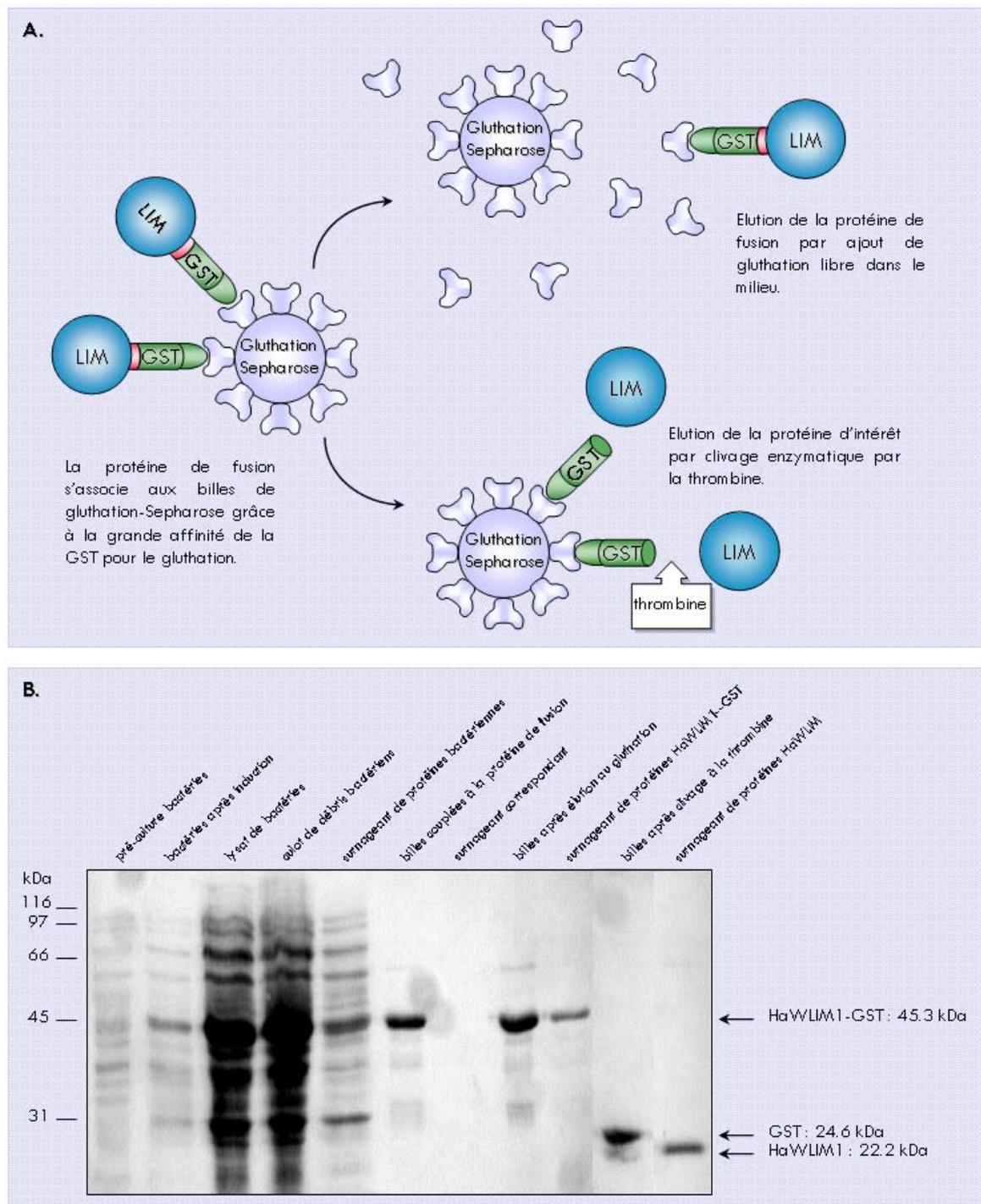
La séquence codante du gène HaWLIM-1 est amplifiée par PCR, puis clonée dans le vecteur pGEX 2-TK de façon à ce que la séquence de HaWLIM-1 soit en phase avec la séquence codante de la GST (Fig. 42 B). Ce vecteur est introduit dans la souche de bactéries compétentes BL-21, afin de produire la protéine de fusion HaWLIM-1-GST. La protéine de fusion a une masse moléculaire approximative de 46.4 kDa, correspondant à 25.5 kDa apportés par la GST de *S. japonicum* et 20.9 kDa, masse moléculaire théorique de la protéine HaWLIM-1 déduite à partir de sa séquence protéique.

Une pré-culture de la bactérie est réalisée durant une nuit à 37°C sous agitation forte, en présence d'ampicilline à 50 mg/l. La culture s'obtient après ensemencement de 100 ml de milieu LB frais (Sigma), additionné d'ampicilline à 50 mg/l, par 5 ml de la pré-culture. L'induction est obtenue en ajoutant à la culture, lorsqu'elle est en début de phase exponentielle de croissance ( $DO_{600\text{ nm}} = 0.6$ ), une solution d'isopropyl  $\beta$  D thiogalactoside (IPTG) à une concentration finale de 0.4 M. Après 4 heures à 37°C sous agitation énergique, les bactéries sont précipitées par centrifugation (2000 x g, 15 min, 4°C), puis le culot bactérien est repris dans du tampon PBS (Annexe 2-27).



**Figure 42.** Obtention de la protéine de fusion W LIM1-GST.

**A.** Vecteur d'expression pGEX 2 TK : ce plasmide contient le promoteur Tac, la phase de lecture codant pour la GST, un site de clivage à la thrombine, un site de phosphorylation (qui permet un éventuel marquage radioactif de la protéine étudiée), et un polylinker suivi de codons d'arrêt dans les trois phases de lecture. **B.** Clonage de la séquence codante du gène HaW LIM-1 dans le plasmide pGEX 2 TK en vue de la production de la protéine de fusion HaW LIM-1-GST. (T: site de clivage pour la thrombine).



**Figure 43.** Purification de la protéine HaWLM1 recombinante.

**A.** Principe de la purification de protéines de fusion avec la GST à l'aide de billes de glutathion-Sepharose. L'obtention de la protéine d'intérêt peut s'effectuer par élution avec du glutathion libre, ou par clivage enzymatique avec la thrombine. **B.** Electrophorèse en gel d'acrylamide d'échantillons protéiques prélevés au cours de la purification de la protéine HaWLM1 recombinante, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

## **B. Purification de la protéine HaWLIM-1 sur-exprimée.**

La purification par affinité est basée sur le fait que la protéine recombinante présente, grâce à la présence de la partie GST, une grande affinité pour le glutathion (Fig. 43-A). La purification s'effectue à l'aide de billes de glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) selon les recommandations du fournisseur. Lorsque ce n'est pas précisé, toutes les étapes s'effectuent à 4°C.

Les bactéries sont incubées 30 minutes sous agitation douce en présence de 1 mg/ml de lysozyme (Sigma), afin de fragiliser les membranes cellulaires. Elles sont ensuite lysées par sonication (12 séries de 5 impulsions de 1 seconde – sonicateur Vibra Cell Bioblock Scientific). La lyse est complétée par adjonction de triton X-100 à 5 %, suivie d'une incubation de 30 minutes sous agitation douce. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation (9000 x g, 10 min, 4°C).

Le surnageant contenant les protéines solubles est mis en contact avec des billes de glutathion-Sepharose, préalablement lavées à plusieurs reprises dans du tampon PBS. La fixation de la protéine HaWLIM-1-GST recombinante avec les billes de glutathion-Sepharose s'effectue durant 30 minutes d'incubation à température ambiante et sous agitation douce. Les billes, sur lesquelles est fixée la protéine HaWLIM-1-GST recombinante, sont ensuite lavées plusieurs fois dans du tampon PBS, puis sédimentées par centrifugation (500 x g, 5 min, 4°C).

Le culot de billes est repris dans du tampon PBS contenant de la thrombine (Amersham Pharmacia Biotech) à une concentration de 20 U/ml, afin de libérer la protéine HaWLIM-1. L'activité enzymatique s'effectue durant une incubation de 2 h à 25°C. La partie GST associée aux billes est éliminée par centrifugation (500 x g, 5 min, 4°C). La protéine HaWLIM-1 purifiée présente dans le surnageant final est ensuite dosée selon la méthode de Bradford.

Il est nécessaire de vérifier par électrophorèse monodimensionnelle, après coloration au bleu de Coomassie, la sur-expression de la protéine de fusion HaWLIM-1-GST, ainsi que la purification de la protéine HaWLIM-1 (Fig. 43-B).

## **C. Purification des anticorps anti-HaWLIM-1.**

Les anticorps polyclonaux de lapin anti-HaWLIM-1, dirigés contre la protéine de fusion HaWLIM-1-GST, sont purifiés par affinité sur la protéine HaWLIM-1 isolée, afin d'éliminer les anticorps dirigés contre la partie GST de la protéine de fusion.

La première étape consiste à faire migrer l'extrait contenant la protéine HaWLIM-1 sur gel d'acrylamide à 12 %. Cette électrophorèse est réalisée pour séparer la protéine HaWLIM-1 des éventuels contaminants protéiques pouvant persister dans l'échantillon à la fin de la purification. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose. Après coloration au rouge Ponceau, la partie de la membrane correspondant à la protéine HaWLIM-1 est découpée.

La deuxième étape représente la réaction de purification au sens strict. La bandelette de nitrocellulose portant la protéine HaWLIM-1 est incubée durant une heure dans une solution de TBS-lait 10 % afin de bloquer les sites aspécifiques. Après un rinçage rapide dans une solution de TBS-lait 1 %, la bandelette est incubée une nuit sous agitation à 4°C dans 1 ml de sérum anti-HaWLIM-1 dilué au 1 : 50<sup>e</sup> dans le tampon TBS-lait 1 %. Après 3 lavages de 15 minutes dans le même tampon, les anticorps sont élués pendant 20 minutes par 1 ml de tampon d'éluion (Annexe 2-28). L'éluat est ensuite neutralisé par l'ajout d'une solution Tris HCl pH 8 (1 v : 5 v).

Les anticorps purifiés peuvent être conservés une dizaine de jour à 4°C en présence de 0.02 % d'azide de sodium, afin d'inhiber le développement bactérien. Il est à noter que les anticorps ainsi purifiés doivent être utilisés à des concentrations beaucoup plus fortes que le sérum non purifié en raison du faible rendement de la purification.

## CYTOLOGIE.

### I. TRAITEMENTS APPLIQUES AUX PROTOPLASTES.

#### A. Dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline.

Les protoplastes d'hypocotyles de tournesol sont cultivés sur lamelles après inclusion dans une maille d'agarose. Les lamelles sont ensuite recouvertes de 1 ml de milieu de culture TLD contenant 5 µM d'oryzaline. Après une heure d'incubation, l'oryzaline est éliminée par plusieurs rinçages dans du milieu TLD.

#### B. Dépolymérisation des microfilaments d'actine par la latrunculine.

La dépolymérisation des microfilaments d'actine par la latrunculine est effectuée suivant un protocole adapté de la méthode décrite par Gibbon et collaborateurs (Gibbon *et al.*, 1999). Les protoplastes d'hypocotyles de tournesol sont cultivés sur lamelles après inclusion dans une maille d'agarose. Les lamelles sont ensuite recouvertes de 1 ml de milieu de culture TLD contenant 0.2 µM de latrunculine. Après 4 heures d'incubation, la latrunculine est éliminée par plusieurs rinçages dans du milieu TLD.

#### C. Fixation des protoplastes.

Le choix d'une méthode de fixation correspond toujours à un compromis entre une bonne préservation des propriétés antigéniques des composés à détecter et la meilleure préservation possible de l'ultrastructure des cellules. Afin de figer les structures cellulaires,

les protoplastes sont fixés par des aldéhydes tels que la paraformaldéhyde (PFA) et la glutaraldéhyde.

► **Protoplastes cultivés en milieu liquide.**

Le mélange aldéhydique est ajouté au milieu de culture contenant les protoplastes en suspension (concentrations finales : PFA 2 %, glutaraldéhyde 0.03 %). Après 2 h d'incubation, les protoplastes fixés sont récupérés par sédimentation, puis lavés deux fois en tampon TRAAS (Annexe 2-29). Le culot de protoplastes est mélangé volume à volume avec de l'agarose Sea Plaque à 1 % en surfusion à 58°C, puis le mélange est étalé sous forme d'un film fin et homogène sur des lamelles 22 x 22 mm préalablement recouvertes d'un film de Poly-L-lysine.

► **Protoplastes cultivés sur lamelles après inclusion dans une maille d'agarose.**

Les lamelles sont disposées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Nunclon), puis recouvertes de 1 ml de solution de fixation, constituée de tampon TRAAS additionné de 2 % de PFA et de 0.03 % de glutaraldéhyde. Après une heure d'incubation, les lamelles sont rincées trois fois dans du tampon TRAAS, afin d'éliminer toute trace du fixateur.

**D. Détermination de l'indice de polymérisation des microtubules (IPM).**

Les protoplastes d'hypocotyles de tournesol ne constituent pas une population de cellules synchronisées (Caumont *et al.*, 1997). A un instant donné, et dans des conditions données, l'état du cytosquelette, et en particulier l'état des microtubules, n'est pas identique d'un protoplaste à un autre. On peut ainsi observer, au sein d'une même population, des protoplastes totalement dépourvus de microtubules, des protoplastes présentant des microtubules ponctiformes, des protoplastes présentant des microtubules courts et des protoplastes présentant des microtubules longs. Ainsi, l'état général de polymérisation des microtubules d'une population de protoplastes est difficile à déterminer. Afin de faciliter cette évaluation, nous proposons une méthode permettant de réaliser la synthèse des observations microscopiques, consistant à calculer un indice de polymérisation des microtubules (IPM) par la relation suivante :

$$IPM = PSM \times 0 + PMP \times 3 + PMC \times 7 + PML \times 10$$

PSM = pourcentage de protoplastes sans microtubules ;

PMP = pourcentage de protoplastes présentant des microtubules ponctiformes ;

PMC = pourcentage de protoplastes présentant des microtubules courts ;

PML = pourcentage de protoplastes présentant des microtubules longs ;

On attribue arbitrairement un coefficient à chaque catégorie de protoplastes selon leur degré de polymérisation. Un IPM égal à zéro est représentatif d'une population dont 100 % des protoplastes sont dépourvus de microtubules, un IPM de 1000 d'une population dont 100 % des protoplastes ont un réseau de microtubules dense et structuré.

## II. MARQUAGES CYTOLOGIQUES.

### A. Immunofluorescence indirecte.

Le choix d'une méthode d'immunocytochimie indirecte est préférable dans le cas où les protéines observées représentent une faible proportion des protéines cellulaires. L'utilisation successive de deux anticorps permet d'amplifier la réaction immunologique de 4 à 10 fois, et facilite ainsi l'observation.

La réaction peut se décomposer en quatre étapes. Les protoplastes fixés sont traités avec du triton X-100 à 0.25 % dans du tampon TRAAS contenant 10 % de DMSO pendant 30 minutes afin d'augmenter la perméabilité membranaire. Dans le but de réduire la fluorescence induite par les aldéhydes libres résiduels, les protoplastes sont incubés 3 fois pendant 10 minutes dans du tampon PBS (Annexe 2-30) contenant 10 mM de cyanoborohydrure de sodium. Ils sont ensuite lavés dans du tampon TBS-Mg<sup>2+</sup> (Annexe 2-31). Les sites de fixation non spécifiques sont saturés par l'incubation des protoplastes avec 5 % de sérum normal de chèvre (NGS) (Sigma) dans du tampon TBS-Mg<sup>2+</sup> pendant 30 minutes. Les protoplastes sont ensuite incubés durant une nuit à température ambiante dans une chambre humide avec les anticorps primaires dilués dans du tampon TBS-Mg<sup>2+</sup>. Les sites de fixation non spécifiques sont saturés par incubation des protoplastes avec 0.1 % de BSA (Research Organics) dans du tampon TBS (Annexe 2-32). Les protoplastes sont ensuite incubés pendant 2 heures avec des anticorps secondaires fluorescents, dilués dans du tampon TBS-BSA. Après deux lavages dans le même tampon, les lamelles sont montées dans du Citifluor (Link Analytical), stabilisateur de la fluorescence.

Le double-marquage consiste à révéler simultanément, sur un même protoplaste, deux protéines distinctes. Le protocole utilisé est similaire à la méthode décrite ci-dessus. Deux types d'anticorps primaires, puis deux types d'anticorps secondaires, sont appliqués simultanément. Il est nécessaire de choisir des anticorps primaires produits chez des espèces animales différentes, afin de pouvoir les révéler à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes différents.

### B. Détermination de la viabilité des protoplastes par l'utilisation du FDA.

Le test de viabilité cellulaire utilisant le FDA est effectué suivant un protocole adapté de la méthode décrite par Power et Chapman (*Power et Chapman, 1985*). Le FDA est une molécule perméante, pouvant pénétrer à l'intérieur des cellules quel que soit leur état physiologique. Cette molécule, composée de d'une partie fluorescéine et d'une partie acétate, ne fluoresce pas à l'état natif. La fluorescence n'est émise que lorsque la fluorescéine est libérée de la partie acétate. Les cellules viables possèdent des estérases cytoplasmiques capable de scinder la molécule en fluorescéine et acétate. La fluorescéine libérée s'accumule dans le cytoplasme lorsque le plasmalemme est intact. Les cellules qui apparaissent fluorescentes correspondent aux cellules qui possèdent à la fois des estérases fonctionnelles et une membrane cytoplasmique intacte.

Le FDA est dilué à la concentration de 50 µg / ml dans le milieu de culture des protoplastes. Après 5 minutes d'incubation à l'obscurité, les protoplastes sont observés à

l'aide d'un microscope à épifluorescence. Le pourcentage de protoplastes vivants est déterminé par la numération d'environ 100 protoplastes sur plusieurs plages prises au hasard.

### C. Marquage des noyaux de protoplastes au DAPI.

Le DAPI est un fluorochrome se fixant spécifiquement sur l'ADN, et permettant ainsi de visualiser les noyaux des protoplastes.

Le DAPI est dilué à la concentration de 5 µg / ml dans le milieu de culture des protoplastes, ou dans la suspension de noyaux de protoplastes. Après 5 min d'incubation, les protoplastes ou les noyaux sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

## III. MICROSCOPIE.

### A. Microscopie conventionnelle.

Les protoplastes en culture sont observés à l'aide d'un microscope inversé (Labovert - Leitz).

Dans le cas de la réalisation d'un marquage fluorescent, les préparations sont examinées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Laborlux 12 ou DMIRBE - Leitz). Trois blocs de filtres (Leitz) sont utilisés selon les molécules traceurs à exciter.

Traceur	Filtre	Bande passante	Miroir séparateur	Filtre d'arrêt
DAPI	A	340-380 nm	400 nm	430 nm
FITC FDA	I2	450-490 nm	510 nm	515 nm
Texas Red	M	546/16 nm	580 nm	580 nm

L'acquisition des images s'effectue grâce à l'utilisation d'une caméra vidéo CCD (Color Coolview, Photonics Science, UK), ou par l'intermédiaire d'un appareil photo Wild Photoautomat MPS 45 muni de films Kodak T Max 400 pour les photographies en lumière visible, et de films Fujichrome 1600 Provia pour les photographies en fluorescence.

### B. Microscopie confocale.

L'intérêt de la microscopie confocale est de permettre l'obtention de coupes optiques fines (inférieures à 0.5 µm) de l'échantillon, en éliminant la lumière émise par des points situés en dehors du plan focal.

Les préparations sont examinées à l'aide d'un microscope confocal inversé (LSM 410 – Zeiss, Jena, Germany) de type CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope), équipé d'un laser à argon (488 nm) associé à un filtre BP 510 - 525 nm, ou d'un laser à hélium (543 nm), associé à un filtre d'émission LP 590 nm. L'acquisition des images est effectuée avec un objectif 63 x/ 1.3 à immersion Plan Neofluar (Zeiss)

### C. Analyse d'images : Quantification de la fréquence de colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec les microfilaments d'actine ou avec les microtubules.

Le traitement et l'analyse des images numériques sont réalisés à l'aide du logiciel Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

Deux images de protoplastes double-marqués sont réalisées, la première correspondant au marquage de la protéine HaWLIM-1 (FITC), et la seconde au marquage des microfilaments d'actine ou des microtubules (Texas Red). Ces images sont seuillées de façon à éliminer la fluorescence de l'arrière plan, puis une région d'intérêt est délimitée sur la surface du protoplaste. Les chloroplastes et le noyau, dont le marquage est particulièrement intense sur certains protoplastes, sont exclus de cette région d'intérêt afin d'éviter les artefacts. Les pixels actifs sur la région d'intérêt sont ensuite dénombrés pour chaque image. Le pourcentage de colocalisation de la protéine HaWLIM-1 avec l'actine ou avec les microtubules est déterminé grâce à la relation suivante :

$$\text{Pourcentage de colocalisation} = \frac{\text{nombre de pixels activés sur les deux images}}{\text{nombre de pixels activés sur l'image HaWLIM-1}} \times 100$$

Cette procédure permet d'obtenir une estimation de la proportion des spots correspondant à la protéine HaWLIM-1 associés aux microfilaments d'actine ou aux microtubules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des pourcentages de colocalisation estimés sur environ 30 protoplastes analysés dans les mêmes conditions.

Il faut garder à l'esprit que cette méthode permet d'obtenir uniquement une estimation de la fréquence de colocalisation entre deux protéines. De plus, dans le cas d'un marquage immunocytologique diffus ou de mauvaise qualité, la technique utilisée peut conduire à l'apparition d'artefacts. Les résultats obtenus doivent donc être pris avec précautions.

# ANNEXES

## ANNEXE n°1

## SEQUENCES NUCLEIQUES DES GENES LIM DE TOURNESOL

La séquence codante du gène apparaît en gras. Les sites d'insertion des introns sont représentés par une étoile (\*). La localisation des amorces utilisées en RT-PCR est indiquée par un surlignage grisé.

## 1. Séquence nucléique du gène HaPLIM-1.

```

          10      20      30      40      50      60
5'      TNNATAACTGGAGCTCGCGCGCTGCAGGTCGACACTAGTGGATCCAAAGGTTCTTTTTC
3'      ANNTATTGACCTCGAGCGCGGACGTCAGCTGTGATCACCTAGGTTTCCAAGAAAAAG

          70      80      90      100     110     120
5'      TTGCGTTATTTATCCAAATAACAAGAGAAAAAGAACTCTTTCATAACCAGAAGAAAAAA
3'      AACGCAATAAATAGGTTTATTGTTCTCTTTTCTTGAGAAAGTTATTGGTCTTCTTTTTT

          130     140     150     160     170     180
5'      ATGAAATCATTACAGGAACAACCCAAAAATGCACAGTCTGCGAGAAAACGTGTATTTG
          pLIM-1 434 007
3'      TACTTTAGTAAGTGTCTTGTGGGTTTTTACGTGTCAGACGCTCTTTTGACACATAAAC

          190     200     210     220     230     240
5'      GTTGATAAATTAGTAGCTAATCAACGTGTTTATCATAAAGCCTGCTCCGATGCCATCAT
3'      CAACTATTTAATCATCGATTAGTTGCACAAATAGTATTTGCGACGAAGGCTACGGTAGTA

          250     260     270     280     290     300
5'      TGCAATAGTACCCTCAAGCTTAGCAACTTCAATTCTTTCGACGGAGTCGTTTATTGTAGG
3'      ACGTTATCATGGGAGTTCGAATCGTTGAAGTTAAGAAAAGCTGCCTCAGCAAATAACATCC
          *

          310     320     330     340     350     360
5'      CATCACTTTGATCAACTCTTCAAGAGAACTGGCAGCTTGAAAAAAGTTTTGATGGAACA
3'      GTAGTAAACTAGTTGAGAAGTTCTCTTGACCGTCGAACCTTTTTTCAAACCTACCTTGT
          *

```

```

          370      380      390      400      410      420
          |       |       |       |       |       |
5'      CCAAAGTTCAAGCCAGAAAGAACATTTAGTCAAGAGACTCAGAGTGCAAACAGACTCTCA
3'      GGTTC AAGTTCGGTCTTTCTTG TAAATCAGTTCTCTGAGTCTCACGTTTGTCTGAGAGT
                                     *

          430      440      450      460      470      480
          |       |       |       |       |       |
5'      AGTTTCTTTGAGGGTACCCGCGACAAATGTAATGCGTGTGCCAAGATCGTTTATCCAATC
3'      TCAAAGAAACTCCCATGGGCGCTGTTTACATTACGCACACGTTTCTAGCAAATAGGTTAG

          490      500      510      520      530      540
          |       |       |       |       |       |
5'      GAGCGGGTTAAGGTGGATGGAAGTGCATACCACAGAGCTTGTTTCAAATGCTGTATGGG
3'      CTCGCCCAATTCCACCTACCTTGACGTATGGTGTCTCGAACAAAGTTTACGACAGTACCC
                                     *

          550      560      570      580      590      600
          |       |       |       |       |       |
5'      GGGTGCACATAAAGCCCATCAAACACTACATTGCTCATGAAGGCAGGCTTTATTGCAAGCAC
3'      CCCACGTGATATTCGGGTAGTTTGATGTAACGAGTACTTCCGTCCGAAATAACGTTTCGTG

          610      620      630      640      650      660
          |       |       |       |       |       |
5'      CACCACATCCAACCTCTTTAAGAAGAAAGGAAACTACAGCCAACCTCGAGGTCGAAGAAACG
3'      GTGGTGTAGGTTGAGAAATCTTCTTTCCTTTGATGTCGGTTGAGCTCCAGCTTCTTTGC

          670      680      690      700      710      720
          |       |       |       |       |       |
5'      GTTGCAGCTCCTGCTGAATCCGAAACCCAAAACGCCGAAACCCAAAACGCTGAAACCCAA
3'      CAACGTCGAGGACGACTTAGGCTTTGGGTTTTGCGGCTTTGGGTTTTGCGACTTTGGGTT

          730      740      750      760      770      780
          |       |       |       |       |       |
5'      AACGCTGACACCCAGAACACTGACACCCAAAATGCAGCCGTTAATAGCTCGATATGATG
3'      TTGCGACTGTGGGTCTTGTGACTGTGGGTTTTACGTCGGCAAATTATCGAGCTATACTAC
                                     pLIM-1 434 006

          790      800      810      820      830      840
          |       |       |       |       |       |
5'      AAGTTTCATTGCTCCGAGATCTTAAGTTCATGTCGTGTTATAAACTGAACTAGCTCGCGA
3'      TTCAAAGTAACGAGGCTCTAGAATTC AAGTACAGCACAAATATTTGACTTGATCGAGCGCT

          850      860      870      880      890      900
          |       |       |       |       |       |
5'      TTTTGTTTTTGTCCAACACTNGATTGTGTTGATTCAATTTAATAAATTTTGTTTTCAA
3'      AAAACAAAACAGGTTGTGANCTAACACAACATAAGTTAAATTTATTTAAAACAAAAGTTT

```

---

```
          910      920      930      940      950      960
5'  ACAAACCCCTGAGTTGGAATACCTGTATTTTAAACAACATGTTTCCTGTATTATTAATAAAA
3'  TGTTTGGGGACTCAACCTTATGGACATAAAATTTGTTGTACAAAGGACATAATAATTTT

          970      980      990      1000     1010     1020
5'  AACATGGCGCGGTTGATACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGTACTTC
3'  TTGTACCGCGCCAACATATGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCTCTCATGAAG

          1030     1040     1050     1060     1070     1080
5'  TAGAGCGGCCGCGGGCCCATCGATTTTCCACCCGGGTGGGTACCAGGTAAGTGTACCCA
3'  ATCTCGCCGGCGCCCGGGTAGCTAAAAGGTGGGCCACCCCATGGTCCATTACATGGGT

          1090     1100
5'  ATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAAT
3'  TAAGCGGGATATCACTCAGCATAATGTTA
```

## 2. Séquence nucléique du gène HaPLIM-2.

```

          730      740      750      760      770      780
5'      GCAAATTTCTTTTTTTTTCTTTGATATTTGATTGTTGGTTCGCCCAACTACATTGG
          |          |          |          |          |
          PLIM-2 421 638
3'      CGTTTAAAGGAAAAAAAAAAGAAACTATAAACTAACCAACCAAGACGGGTTGATGTAACC

          790      800      810      820      830      840
5'      ATTCCTTTCCTCATTATAACTTGTTTTTTATATCAGAAAGGATAAAAATGGCGTTTGGT
          |          |          |          |          |
3'      TAAGGAAAGAAGTAAATATTGAACAAAAATATAGTCTTTCCTATTTTTACCGCAAACCA

          850      860      870      880      890      900
5'      GGAACCATCGACAAATGCAATGCTTGCATAAGACTGTTTCATTTTGTGATTTAATGACC
          |          |          |          |          |
3'      CCTTGGTAGCTGTTTACGTTACGAACGCTATTCTGACAAGTAAACAACCTAAATTACTGG

          910      920      930      940      950      960
5'      GTTGACAATGTCATTTATCACA AAAAGTGC TTCAAATGCACCCATTGCAAAGGCACCTTT
          |          |          |          |          |
3'      CAACTGTTACAGTAAATAGTGT TTTTACGGAAGTTTACGTGGGTAACGTTTCCGTGAGAA

          970      980      990      1000     1010     1020
5'      GTGATGAGCAACTACTCCTCCATGGATGGCGTACTCTATTGCATGCCTCATTTCGAACAA
          |          |          |          |          |
3'      CACTACTCGTTGATGAGGAGGTACCTACCGCATGAGATAACGTACGGAGTAAAGCTTGTT

          1030     1040     1050     1060     1070     1080
5'      CTTTTCAAAGAACTGGAAATTACAGCAAAAATTTTCGTACATCAAAGCTAAATAGGGAC
          |          |          |          |          |
3'      GAAAAGTTTCTTTGACCTTTAATGTCGTTTTTAAAAGCATGTAGTTTCGATTTATCCCTG

          1090     1100     1110     1120     1130     1140
5'      AATCAACGGCACAGTTACCAACAAATTCATATCTTTTCGGTACCTGGACAAATGC
          |          |          |          |          |
3'      TTAAGTTGCCGTGTCAATGTTTGT TTAAGAGTATAAGAAAAGCCATGGACCTGTTTACG

          1150     1160     1170     1180     1190     1200
5'      CGAATTTGTGAAAAGACTGTCTATTTTATTGACAAGATGACAATGGAAGGCGAATCATAT
          |          |          |          |          |
3'      GCTTAAACACTTTTCTGACAGATAAAAATAACTGTTCTACTGTTACCTTCCGCTTAGTATA

```

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 5' CACAAGCAATGCTTTAGGTGTGTTACGGAGGGTGTCTTTAACACACTCATCGTATGCT  
 3' GTGTTTCGTTACGAAATCCACACAAGTGCCTCCACAGGAAATGTGTGAGTAGCATACGA

1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 5' GCCCTCAACGGAAATCTCTACTGCAGACACCATTTTGCTCAACTCTTCTAGAAAAAGGC  
 3' CGGGAGTTGCCTTTAGAGATGACGTCTGTGGTAAAACGAGTTGAGAAGGATCTTTTTCCG

1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 5' ACATTGTCTCACGTTCTCAAGGCTGCTGCAGACCGTAAGAAAAACACAATACCCGATCAC  
 3' TGTAACAGAGTGCAAGAGTTCCGACGACGTCTGGCATTCTTTTTGTGTTATGGGCTAGTG

1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 5' CAAGCTGAAGCTGAAAAGGTACCCCTACCCGAACAAGAAAGTGAGGTTGAGAAGGCACTC  
 3' GTTCGACTTCGACTTTTCCATGGGGATGGGCTTGTCTTTCACTCCAACCTCTCCGTGAG

1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 5' GAACCACAACAGGAAATCAAGTTGAAAAGGTAGCTGAAACTGAAGTTGAAAGCAAACATA  
 3' CTTGGTGTTCCTTTTAGTTCAACTTTTCCATCGACTTTGACTTCAACTTCGTTTGAT

1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 5' GATACTACAGAAGAAGTCGATGATGAACAAGAATCCGAGACAGTTTAAACGTCACAAATC  
 3' CTATGATGTCTTCTTCAGCTACTACTTGTCTTAGGCTCTGTCAAATTTGCAGTGTTTAG

1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 5' GTGTTTGTGTTACTGAAAAGTAATTTTATTTGTCTATACTGTTGTATGTCATTGTTG  
 3' CACAAACACAATGACTTTTCATTAATAAAACAGATATGTTGACAACATACAGTAACAAC  
*pLIM-2 421 639*

1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 5' TTTGCTATCATGATTCTGGGATGAACAATAAAAATAAAATCCAATATTTCAAACCTAATA  
 3' AAACGATAGTACTAAGACCCTACTTGTATTTTTATTTTAGGTTATAAAGTTTGAGATTT

1690 1700 1710 1720 1730 1740  
 5' AAAAAAAAAAAAAAAGTCTGAGAGTACTTCTAGAGCGGCCGCGGGCCATCGATTTTCCAC  
 3' TTTTTTTTTTTTTTTGAGCTCTCATGAAGATCTCGCCGGCCCGGGTAGCTAAAAGGTG

1750 1760 1770 1780 1790  
5' CCGGGTGGGGTACCAGGTAAGTGTACCCATTCGCCCTATATGATCGTATACAATNC  
3' GGCCACCCCATGGTCCATTACATGGGTAAGCGGGATATACTAGCATATGTTANG

### 3. Séquence nucléique du gène HaWLM-1.

```

      10      20      30      40      50      60
5' ATGGCATTTCAGGCACTACCCAGAAATGCATGGCATGTGACAAGACTGTCTACTTGGTG
      wLIM 450 386
      wLIM 2030
3' TACCGTAAACGTCCGTGATGGGTCTTTACGTACCGTACACTGTTCTGACAGATGAACCA

      70      80      90      100     110     120
5' GACAAACTCACTGCTGATAACAGGGTGTTCACAAAGCTTGCTTCAGATGCCACCATTGC
3' CTGTTTGAGTGACGACTATTGTCCCACAAAGTGTTCGAACGAAGTCTACGGTGGTAACG

      130     140     150     160     170     180
5' AATGGCACACTAAAGCTCAGTAACTACAACCTCTTTGAGGGTGTTCCTTATTGCAGGCCA
3' TTACCGTGTGATTTTCGAGTCATTGATGTTGAGGAACTCCCAAGAAATAACGTCCGGT
      *

      190     200     210     220     230     240
5' CACTTTGATCAGCTGTTCAAGAAAACCTGGTAGTTTGGATAAGAGCTTTGAAGGCACACCG
3' GTGAAACTAGTCGACAAGTTCTTTTGACCATCAAACCTATTCTCGAAACTTCCGTGTGGC

      250     260     270     280     290     300
5' AACATTGTGAAGCAACCGAAAACCATTTGATGGCGAGAAACCAATGGCAAATAAAGTCTCG
3' TTGTAACACTTCGTTGGCTTTTGGTAACTACCGCTCTTTGGTTACCGTTTATTTCAGAGC
      *

      310     320     330     340     350     360
5' AGTATGTTTGTGGGAACGAAAGATAAGTGTTTGGGGTGTGAAGAACACAGTTTACCCAACC
3' TCATACAAACACCCTTGCTTTCTATTCAAAACCCACATTCTTGTGTCAAATGGGTTGG

      370     380     390     400     410     420
5' GAAAAGGTTTCTGTGAACGGAAGTGCATACCACAAAAGTTGCTTTAAATGTAGCCATGGA
3' CTTTTCCAAGACACTTGCCCTTGACGTATGGTGTTCACGAAATTTACATCGGTACCT
      *

      430     440     450     460     470     480
5' GGTTGTACAATCAGCCCATCGAATTATATCGCGCATGAAGGTCATCTCTACTGCAGACAC
3' CCAACATGTTAGTCGGGTAGCTTAATATAGCGGTACTTCCAGTAGAGATGACGCTCTGTG

```

490      500      510      520      530      540  
 |      |      |      |      |      |  
 5' CACCACACCCAACTCATCAAAGAGAAGGGTAACCTGAGCCAACCTCGAGGGTGAGCGTTCT  
 3' GTGGTGTGGGTTGAGTAGTTTCTCTTCCCATTGGACTCGGTTGAGCTCCCACTCGCAAGA

550      560      570      580      590      600  
 |      |      |      |      |      |  
 5' GCAAGGGTCGGAGAAACCGCACCTTGAATGTTACTTTGATGACCATCTTATAACCTTTTG  
 3' CGTTCCCAGCCTCTTTGGCGTGGAACTTACAATGAAACTACTGGTAGAATATTGGAAAAAC  
*wLIM 450 387*

610      620      630      640      650      660  
 |      |      |      |      |      |  
 5' CAACCTATGTTTTTTGTTATTGGTGTGTATGATTGATAAAGATATGCAAGTCTGTTGTGT  
 3' GTTGATACAAAAACAATAACCACAACATACTAACTATTTCTATACGTTTCAGACAACACA

670      680      690      700      710      720  
 |      |      |      |      |      |  
 5' TTTGCTTTGCTTTGCTTTGCTTTGTGACACTTCGATATATTGGATTTAAGAGTGTATGCTT  
 3' AAACGAAACGAAACGAAACGAACTGTGAAGCTATATAACCTAAATCTCACATACGAA

730  
 |  
 5' CCAAAAAAGCGGCCGC  
 3' GGTTTTTTCGCCGGCG  
*wLIM 2708*

## ANNEXE n°2

## COMPOSITION DES MILIEUX ET TAMPONS

## MILIEUX DE CULTURE IN VITRO.

1. Milieu de germination des akènes de tournesol  
(Murashige et Skoog, 1962).

<b>Macroéléments</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20 mM
KNO <sub>3</sub>	18 mM
CaCl <sub>2</sub>	3 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
<b>Microéléments</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.1 mM
MnSO <sub>4</sub>	0.1 mM
ZnSO <sub>4</sub>	29 µM
CoCl <sub>2</sub>	0.1 µM
CuSO <sub>4</sub>	0.1 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1 µM
KI	5 µM
<b>Vitamines</b>	
Acide nicotinique	4.1 µM
Pyridoxine HCl	2.4 µM
Thiamine HCl	0.3 µM
Glycine	26 mM
Myo-inositol	0.5 mM
<b>Fer chélaté</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	0.1 mM
FeSO <sub>4</sub>	0.1 mM
<b>Gélifiant</b>	
Bacto-agar	8 g / l
<b>Sucres</b>	
Saccharose	58 mM
<b>pH</b>	<b>5.8</b>

**2. Milieu S (Chupeau et al., 1974).**

KCl	335 mM
CaCl <sub>2</sub>	13.6 mM
MES	3.5 mM
<b>pH</b>	<b>5.6</b>

**3. Gradient de ficoll.**

Phase inférieure	milieu S à 10 % de ficoll
Phase supérieure	milieu S à 0 % de ficoll

**4. Milieu TLD (Chanabé et al., 1991).**

<b>Macroéléments</b>	
CaCl <sub>2</sub>	3 mM
MgSO <sub>4</sub>	3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 mM
KCl	15 mM
<b>Microéléments</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.1 mM
MnSO <sub>4</sub>	1 µM
ZnSO <sub>4</sub>	0.9 µM
CoCl <sub>2</sub>	0.1 µM
CuSO <sub>4</sub>	0.01 µM
NaMoO <sub>4</sub>	24 µM
<b>Vitamines</b>	
Acide nicotinique	8 µM
Pyridoxine HCl	4.8 µM
Thiamine HCl	3 µM
Pantholénate de calcium	2 µM
Biotine	0.04 µM
Myo-inositol	0.5 mM
<b>Sucres</b>	
Mannitol	0.4 M
Saccharose	14 mM
<b>Autres éléments</b>	
Glutamine	7.5 mM
Citrate de fer	0.2 mM
MES	0.3 mM
Tween 80	800 µl / l

**Milieu TLD (suite).**

<b>Hormones</b>	
ANA	16 $\mu$ M
BAP	4.4 $\mu$ M
2.4 D	0.45 $\mu$ M
<b>pH</b>	<b>5.8</b>

**METHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES.****5. Tampon de charge pour l'électrophorèse des acides nucléiques.**

Glycérol	30 %
Bleu de bromophénol	0.25 %
Orange G	0.4 %

**6. Tampon TBE.**

Tris	90 mM
Borate	90 mM
EDTA	2 mM
<b>pH</b>	<b>8.0</b>

**7. Tampon d'extraction pour ARN du kit « PolyAtract System 1000 » (Promega).**

guanidine thiocyanate	4 M
citrate de sodium	25 mM
Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0.25 %
Béta mercaptoéthanol	2 %
<b>pH</b>	<b>7.0</b>

**8. Tampon SSC pour ARN du kit « PolyAtract System 1000 » (Promega).**

NaCl	3 M
Citrate de sodium	0.3 M
<b>pH</b>	<b>7.0</b>

**9. Tampon d'extraction LiCl pour ARN (De Vries et al., 1988).**

LiCl	100 mM
Tris HCl	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	1 %
<b>pH</b>	<b>9.0</b>

**10. Tampon d'extraction CTAB pour ARN.**

CTAB	2 %
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
Tris	100 mM
Béta mercaptoéthanol	0.2 %
<b>pH</b>	<b>8.0</b>

**11. Tampon d'extraction isothiocyanate de guanidium pour ARN (Shepherd et al., 1983).**

Citrate de sodium	25 mM
Guanidine thiocyanate	5 M
Sarcosyl	0.5 %
EDTA	2 mM
Béta mercaptoéthanol	5 %
SDS	1 %
<b>pH</b>	<b>7.0</b>

**12. Tampon de réaction pour traitement DNase (Promega).**

Tris HCl	400 mM
MgSO <sub>4</sub>	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
<b>pH</b>	<b>8.0</b>

**13. Solution Stop pour traitement DNase (Promega).**

EGTA	20 mM
<b>pH</b>	<b>8.0</b>

**14. Tampon de réaction pour transcription inverse (Clontech).**

Tris HCl	50 mM
KCl	75 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
<b>pH</b>	<b>8.3</b>

**METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.****15. Tampon de Laemmli (Laemmli, 1970).**

Tris HCl	0.5 M
SDS	4 %
Glycérol	20 %
Leupeptine	0.042 mM
PMSF	1 mM
<b>pH</b>	<b>6.8</b>

**16. Tampon de lyse.**

leupeptine	0.1 mg/ml
pepstatine	0.02 mg/ml
aprotinine	0.04 mg/ml
DTT	0.4 mM
PMSF	4 mM
Nonidet P40	0.5 %
Triton X-100	5 %
<b>dilutions dans le milieu noyau</b>	

**17. Milieu Noyaux (Stoppin et al., 1994).**

saccharose	17 %
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
MES	25 mM
<b>pH</b>	<b>5.5</b>

**18. Gel de séparation pour électrophorèse de protéines.**

Tris HCl	0.38 M
SDS	0.1 %
Acrylamide	12 %
Persulfate d'ammonium	0.1 %
TEMED	0.1 %
<b>pH</b>	<b>8.8</b>

**19. Gel de concentration pour électrophorèse de protéines.**

Tris HCl	0.125 M
SDS	0.1 %
Acrylamide	3 %
Persulfate d'ammonium	0.1 %
TEMED	0.1 %
<b>pH</b>	<b>6.8</b>

**20. Tampon de charge pour protéines.**

Tris Hcl pH 6.8	60 mM
SDS	2 %
Glycérol	10 %
Bleu de bromophénol	2 %
Béta mercaptoéthanol	4 %

**21. Tampon de cuve pour électrophorèse de protéines.**

Tris	25 mM
SDS	0.1 %
Glycine	0.192 M
<b>pH</b>	<b>8.3</b>

**22. Solution de transfert pour protéines.**

Tris	50 mM
Glycine	190 mM
SDS	0.1 %
Méthanol	20 %

**23. Tampon TBS protéines.**

Tris	10 mM
NaCl	0.009 %
<b>pH</b>	<b>7.4</b>

**24. Solution de bleu de Coomassie.**

Bleu de Coomassie	0.1 %
Méthanol	50 %
Acide acétique	10 %

**25. Solution décolorante.**

Méthanol	35 %
Acide acétique	10 %

**26. Tampon TBS-lait.**

Tris	10 mM
NaCl	0.009 %
Lait en poudre Régilait	10 % ou 1 %
Tween 80	0.1 %
<b>pH</b>	<b>7.4</b>

**27. Tampon PBS.**

NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8 mM
<b>pH</b>	<b>7.3</b>

**28. Tampon d'élution.**

Glycine HCl	0.2 M
EGTA	1 mM
<b>pH</b>	<b>2.8</b>

**CYTOLOGIE.****29. Tampon TRAAS (*Traas et al., 1989*).**

Pipes	50 mM
EGTA	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	5 mM
Nonidet P40	0.08 %
<b>pH</b>	<b>6.9</b>

**30. Tampon PBS pour immunocytologie.**

NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.1 mM
NaN <sub>3</sub>	20 mM
<b>pH</b>	<b>7.4</b>

**31. Tampon TBS-MG<sup>2+</sup>.**

Tris	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	29.5 mM
<b>pH</b>	<b>7.6</b>

**32. Tampon TBS pour immunocytologie.**

Tris	20 mM
NaCl	0.15 mM
<b>pH</b>	<b>8.2</b>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agulnick, AD, Taira, M, Breen, JJ, Tanaka, T, Dawid, IB, et Westphal, H (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb-1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* 384, 270-272.
- Allona, I, Quinn, M, Shoop, E, Swope, K, Cyr, SS, Carlis, J, Riedl, J, Retzel, E, Campbell, MM, Sederoff, R, et Whetten, RW (1998). Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9693-9698.
- Arber, S (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arber, S, et Caroni, P (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes & Development* 10, 289-300.
- Arber, S, Halder, G, et Caroni, P (1994). Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79, 221-231.
- Arber, S, Hunter, J, Ross, J, Hongo, M, Sansig, G, Borg, J, Perriard, J, Chien, K, et Caroni, P (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organisation, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88, 393-403.
- Bach, I (1995). The LIM domain : regulation by association. *Mech. Dev.* 91, 5-17.
- Bach, I, Carrière, C, Ostendorff, HP, Andersen, B, et Rosenfeld, MG (1997). A family of LIM domain associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11, 1370-1380.
- Baltz, R, Domon, C, Pillay, D, et Steinmetz, A (1992). Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein. *The Plant Journal* 2, 713-721.
- Baltz, R, Evrard, J, Domon, C, et Steinmetz, A (1996). The pollen specific LIM protein PLIM-1 from sunflower binds nucleic acid in vitro. *Sex Plant Reprod.* 9, 264-268.
- Baltz, R, Schmit, AC, Kohlen, M, Hentges, F, et Steinmetz, A (1999). Differential localization of the LIM domain protein PLIM-1 in microspores and mature pollen grains from sunflower. *Sexual Plant Reproduction* 12, 60-65.
- Baltz, R, et Steinmetz, A (1998). Nucleotide sequence of a cDNA encoding PLIM-2, a novel pollen-specific LIM domain protein from sunflower. *GenBank Accession n° AF047353*.
- Barthou, H, Brière, C, Caumont, C, Petitprez, M, Kallerhoff, J, Borin, C, Souvré, A, et Alibert, A (1997). Effect of atmospheric pressure on sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplast division. *Plant Cell Reports* 16, 310-314.
- Bergey, DR, Ryan, CA (1999). Wound and systemin inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol Biol* 40, 815-823.

- Blank, V, Kourisky, P, et Israël, A (1992). NF-KB and related proteins : rel / dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem. Sci.* 17, 135-140.
- Bourgoin, C, Lundgren, SE, et Thomas, JB (1992). Apterous is a Drosophila LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9, 549-561.
- Brown, MC, Perrota, JA, et Turner, CE (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxilin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *Journal of Cell Biology* 135, 1109-1123.
- Brown, S, McGrath, J, Ooms, LM, Gurung, R, Maimonet, MM, et Mitchell, CA (1999). Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. *Journal of Biological Chemistry* 274, 27083-27091.
- Caumont, C, Petitprez, M, Woynaroski, S, Barthou, H, Brière, C, Kallerhoff, J, Borin, C, Souvère, A, et Alibert, G (1997). Agarose embedding affects cell wall regeneration and microtubule organization in sunflower hypocotyls protoplasts. *Physiologia Plantarum* 99, 129-134.
- Chanabé, C, Burrus, M, Alibert, G, et Bidney, D (1991). Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell Reports* 9, 635-638.
- Chang-Jie, J, et Sonobe, S (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher plant microtubule-associated protein. *J. Cell Sci.* 105, 891-901.
- Chupeau, Y, Missonier, C, Hommel, MV, et Goujoud, J (1974). Somatic hybrids of plants by fusion of protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 165, 239-245.
- Cleary, AL, et Hardham, AR (1990). Reinstatement of microtubules arrays from cortical nucleating sites in stomatal complexes of *Lolium rigidum* following depolymerization of microtubules by oryzalin and high pressure. *Plant Cell Physiol.* 31, 903-915.
- Cohen, B, McGuffin, ME, Pfeifle, C, Segal, D, et Cohen, SM (1992). Apterous, a gene required for imaginal disc development in Drosophila encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev.* 6, 715-729.
- Colasanti, J, Cho, SO, Wick, S, et Sundaresan, V (1993). Localization of the functional p34cdc2 homolog of maize in root tip and stomatal complex cells : association with predicted division sites. *Plant Cell* 5, 1101-1111.
- Courbou, I, Badaoui, S, Mouzeyar, S, Gentzbittel, L, et Nicolas, P (1997). RT-PCR cloning of a sunflower calmodulin gene. *Plant Physiol.* 114, 395.

- Crawford, AW, Pino, JD, et Beckerle, MC (1994). Biochemical and molecular characterization of the chicken cysteine-rich protein, a developmentally regulated LIM-domain protein that is associated with the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 124, 117-127.
- Davis, LH, Davis, JQ, et Bennett, V (1992). Ankyrin regulation : an alternatively spliced segment of the regulation domain functions as an intramolecular modulator. *J. Biol. Chem.* 267, 18966-18972.
- Dawid, I, Breen, J, et Toyama, R (1998). LIM domains : multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *TIG* 14, 156-162.
- Dawid, I, Toyama, R, et Taira, M (1995). LIM domain proteins. *C.R. Acad.Sci.Paris, Life Sciences* 318, 295-306.
- De Vries, S, Hoge, H, et Bisseling, T. (1988). Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues., Volume B6.
- Durick, K, Gill, GN, et Taylor, SS (1998). Shc and enigma are both required for mitogenic signaling by ret / ptc 2. *Mol. Biol. Cell* 18, 2298-2308.
- Durso, NA, et Cyr, RJ (1994). A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor 1 alpha. *Plant Cell* 6, 893-905.
- Edmondson, DG, et Olson, EN (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.* 268, 755-758.
- Edwards, DC, et Gill, GN (1999b). Structural features of LIM kinase that control effects of the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 11352-11361.
- Edwards, DC, Sanders, LC, Bokoch, GM, et Gill, GN (1999a). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology* 1, 253-259.
- Eliasson, A, Gass, N, Hamman, P, et Steinmetz, A (1999c). Nucleotide sequence of the tobacco gene encoding the pollen LIM domain protein NtPLIM-1. *GenBank Accession n° AF184885*.
- Eliasson, A, Gass, N, Mundel, C, Baltz, R, Kräuter, R, Evrard, JL, et Steinmetz, A (2000). Molecular and expression analysis of a LIM protein gene family from flowering plants. *Mol. Gen. Genet.* (in press).
- Eliasson, A, Hamman, P, et Steinmetz, A (1998). Nucleotide sequence of sunflower gene encoding the LIM domain protein Ha-PLIM-2. *GenBank Accession n° AF116850*.
- Eliasson, A, Hamman, P, et Steinmetz, A (1999a). Nucleotide sequence of the tobacco gene encoding the pollen LIM protein NtPLIM-2. *GenBank Accession n° AF116851*.

- Eliasson, A, Hammann, P, et Steinmetz, A (1999b). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the tobacco LIM protein NtWLIM-1. GenBank Accession n° 184109.
- Evrard, JL (1997). *Arabidopsis thaliana* ATL-1 gene. EMBL Accession n° X74319.
- Faulkner, G, Pallavicini, A, Formentin, E, Comelli, A, Ivoletta, C, Trevisan, S, Borteletto, G, Scannapieco, P, Salamon, M, Mouly, V, Valle, G, et Lafranchi, G (1999). ZASP : a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J. Cell Biology* 146, 465-475.
- Feuerstein, R, Wang, X, Song, D, Cooke, N, et Liebhaber, S (1994). The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10655-10659.
- Flick, MJ, et Konieczny, SF (2000). The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of spectrin. *Journal of Cell Science* 113, 1553-1564.
- Freyd, G, Kim, SK, et Horvitz, HR (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344, 876-879.
- Fung, YW, Wang, RX, Heng, HH, et Liew, CC (1995). Mapping of a human LIM protein (CLP) to human chromosome 11p15.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 28, 602-603.
- Gass, N, Eliasson, A, Hamman, P, et Steinmetz, A (1999). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the tobacco LIM domain protein NtWLIM-2. GenBank Accession n° AF184886.
- German, MS, Wang, J, Chadwick, RB, et Rutter, WJ (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeodomain protein and a basic helix-loop-helix protein : building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* 6, 2165-2176.
- Gibbon, BC, Kovar, DR, et Staiger, CJ (1999). Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *The Plant Cell* 11, 2349-2363.
- Golsteyn, RM, Beckerle, MC, Koay, T, et Friederich, E (1997). Structural and functional similarities between the human cytoskeleton protein zyxin and the protein of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Science* 110, 1893-1906.
- Guy, PM, Kenny, DA, et Gill, GN (1999). The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to beta-tropomyosin. *Molecular Biology of the Cell* 10, 1973-1984.
- Hagmann, J, Grob, M, Welman, A, VanWilligen, G, et Burger, MM (1998). Recruitment of the LIM protein hic-5 to focal contacts of human platelets. *Journal of Cell Science* 111, 2181-2188.
- Hiraoka, J, Okano, I, Iguchi, O, Yang, N, et Mizuno, K (1996). Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain. *FEBS Letter* 399, 117-121.

- Hobert, O, Mori, I, Yamashita, Y, Honda, H, Ohshima, Y, Liu, Y, et Ruvkum, G (1997). Regulation of interneuron function in the *C. elegans* thermoregulatory pathway by the *ttx-3* LIM homeobox gene. *Neuron*. 19, 345-357.
- Huber, A, Neuhuber, WL, Klugbauer, N, Ruth, P, et Allescher, HD (2000). Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 275, 5504-5511.
- Hugdahl, JD, Bokros, CL, et Morejohn, LC (1995). End-to-end annealing of plant microtubules by the p86 subunit of eucaryotic initiation factor (iso)4F. *Plant Cell* 7, 2129-2138.
- Jablonsky, PP, Elliot, J, et Williamson, RE (1993). Purification of a mung bean protein binding to microtubules through two defined sites in the carboxy-terminal domain of beta-tubulin. *Plant Science* 94, 35-45.
- Jiang, CJ, et Sonobe, S (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher plant microtubule associated protein. *J. Cell Sci.* 105, 891-901.
- Johnson, JD, Zhang, W, Rudnick, A, Rutter, WJ, et German, MS (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins : the LIM-2 domain determines specificity. *Mol. Cell Biology* 17, 3488-3496.
- Jurata, L, Kenny, A, et Gill, G (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11693-11698.
- Karlsson, O, Thor, S, Norbeg, T, H., O, et Edlund, T (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344, 879-882.
- Kawaoka, A, Kaothien, P, Yoshida, K, Endo, S, Yamada, K, et Ebinuma, H (2000). Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlim1 involved in lignin biosynthesis. *The Plant Journal* 22, 289-301.
- Kiess, M, Scharm, B, Aguzzi, A, Hajnal, A, Klemen, R, Schwarte-Waldhoff, I, et Schafer, R (1995). Expression of *ril*, a novel LIM domain gene, is down regulated in Hras-transformed cells and restored in phenotypic revertants. *Oncogene* 10, 61-68.
- Kong, Y, Flick, MJ, Kudla, AJ, et Konieczny, SF (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell Biol* 17, 4750-4760.
- Konrat, R, Krautler, B, Weiskirchen, R, et Bister, K (1998). Structure of cysteine and glycine-rich protein CRP-2. Backbone dynamics reveal motional freedom and independent spatial orientation of the LIM domains. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23233-23240.

Kotake, K, Ozaki, N, Mizuta, M, Sekiya, S, Inagaki, N, et Seino, S (1997). Noc-2, a putative zing finger protein involved in exocytosis in endocrine cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29407-29410.

Koukouritaki, SB, Vardaki, EA, Papakonstanti, EA, Lianos, E, Stournaras, C, et Emmanouel, DS (1999). TNF-alpha induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase. *Molecular Medicine* 5, 382-392.

Ku, H, et Meier, KE (2000). Phosphorylation of paxillin via the ERK mitogen-activated protein kinase cascade in EL4 thymoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11333-11340.

Kuroda, S, Tokunaga, C, Kiyohara, Y, Higuchi, O, Konishi, H, Mizuno, K, Gill, GN, et Kikkawa, U (1996). Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 31029-30132.

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamb, P, et McKnight, SL (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation : the benefits of heterotypic dimerization. *Trends in Biochem. Sci.* 16, 417-422.

Lancelle, SA, et Hepler, PK (1991). Association of actin with cortical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. *Protoplasma* 165, 167-172.

Liebhaver, SA, Emery, JG, Urbanek, JG, Wang, X, et Cooke, NE (1990). Characterization of a human cDNA encoding a widely expressed and highly conserved cysteine-rich protein with an unusual zinc-finger motif. *Nucleic Acids Res.* 18, 3871-3879.

Liu, S, Thomas, SM, Woodside, DG, Rose, DM, Klosses, WB, Pfaff, M, et Ginsberg, MH (1999). Binding of paxillin to alpha 4 integrins modifies integrin - dependent biological responses. *Nature* 402, 676-681.

Louis, HA, Pino, JD, Scmeichel, KL, Pomies, P, et Beckerle, MC (1997). Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J. Biol. Chem.* 272, 27484-27491.

Lundgren, SE, Callahan, CA, Thor, S, et Thomas, JB (1995). Control of neuronal pathway selection by the drosophila LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* 121, 1769-1773.

Maekawa, M, Ishizaki, T, Boku, S, Watanabe, N, Fujita, A, Iwamatsu, A, Obinata, T, Ohashi, K, Mizuno, K, et Narumiya, S (1999). Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.

- Maekawa, T, Ogihara, S, Murofushi, H, et Nagai, R (1990). Green algal microtubule-associated protein with a molecular weight of 90 kDa wick bundles microtubules. *Protoplasma* 158, 10-18.
- Marc, J, Sharkey, DE, Durso, NA, Zhang, M, et Cyr, RJ (1996). Isolation of a 90 kDa microtubules-associated protein from tobacco membranes. *Plant Cell* 8, 2127-2138.
- Mazars, C, Thion, L, Thuleau, P, Graziana, A, Knight, MR, Moreau, M, et Ranjeva, R (1997). Organisation of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell Clacium* 22, 413-420.
- Mizuno, K, Okano, I, Ohashi, K, Nunoue, K, Kuma, K, Miyata, T, et Nakamura, T (1994). Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* 9, 1605-1612.
- Morgan, MJ, et Madgwick, AJ (1996). SLim defines a novel family of LIM proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophy Res Commun* 225, 632-638.
- Morgan, MJ, Madgwick, AJ, Charleston, B, Pell, JM, et Loughna, PT (1995). The developmental regulation of a novel muscle LIM protein. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 840-846.
- Mundel, C. (1998). Etude de WLIM-1, une protéine à domaines LIM de tournesol (*Helianthus annuus* L.). Faculté des Sciences de la Vie (Strasbourg: Université Louis Pasteur), pp. 81.
- Mundel, C, Baltz, R, Eliasson, A, Bronner, R, Gass, N, Kräuter, R, Evrard, JL, et Steinmetz, A (2000). A LIM-domain protein from sunflower is localized to the cytoplasm and/or nucleus in a wide variety of tissues and is associated with the phragmoplast in dividing cells. *Plant Molecular Biology* 42, 291-302.
- Mundel, C, Kräuter, R, Hamman, P, et Steinmetz, A (1999). Nucleotide sequence of the sunflower gene encoding the LIM domain protein WLIM-1. *GenBank Accession n° AF116849*.
- Murashige, T, et Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissus culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nagao, RT, Shah, DM, Eckenrode, VK, et Meagher, RB (1981). Multigene family of actin-related sequences isolated from a soybean genomic library. *DNA* 1, 1-9.
- Narasimhulu, SB, et Reddy, ASN (1998). Characterization of microtubule binding domains in the Arabidopsis kinesin-like calmodulin binding protein. *The Plant Cell* 10, 957-965.
- Nick, P, Lambert, AM, et Vantard, M (1995). A microtubule-associated protein in maize is induced during phytochrome-dependent cell elongation. *Plant J.* 8, 835-844.

- Nix, DA, et Beckerle, MC (1997). Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein zyxin : a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J. Cell. Biol.* 138, 1139-1147.
- Nunoue, K, Ohashi, K, Okano, I, et Mizuno, K (1995). LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif containing protein kinase family. *Oncogene* 11, 701-710.
- Osada, H, Grutz, G, Axelson, H, Forster, A, et Rabbitts, TH (1995). Association of erythroid transcription factors : complexes involving the LIM protein Rbtn-2 and the zinc finger protein GATA-1. *Proc Natl Acad Sci* 92, 9585-9589.
- Pawson, T, et Gish, GD (1992). SH2 and SH3 domains : From structure to function. *Cell* 71, 359-362.
- Perez-Alvarado, G, Kosa, J, Louis, H, Beckerle, M, Winge, D, et Summers, M (1996). Structure of the cysteine-rich intestinal protein, CRIP. *J. Mol. Biol.*, 153-174.
- Perez-Alvarado, GC, Miles, C, Michelsen, JW, Louis, HA, Winge, DR, Beckerle, MC, et Summers, MF (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich proteine CRP. *Nature Struct. Biol.* 1, 388-398.
- Petit, MMR, Fradelizi, J, Golsteyn, RM, Ayoubi, TAY, Menichi, B, Louvard, D, VandeVen, WJM, et Friederich, E (2000). LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Molecular Biology of the Cell* 11, 117-129.
- Petitprez, M, Brière, C, Borin, C, Kallerhoff, J, Souvré, A, Alibert, G (1995). Characterization of protoplasts from hypocotyls of *Helianthus annuus* in relation to their tissue origin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41, 33-40.
- Pfaff, SL, Mendelson, M, Steward, CL, Edlund, T, et Jessel, TM (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependant step in interneuron differentiation. *Cell* 84, 309-320.
- Pomies, JT, Louis, HA, et Beckerle, MC (1997). CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with alpha actinin. *Journal of Cell Biology* 139, 157-168.
- Pomies, P, Macalma, T, et Beckerle, MC (1999). Purification and characterization of an alpha-actinin-binding PDZ-LIM protein that is up-regulated during muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 29242-29250.
- Porter, FD, Drago, J, Xu, Y, Cheema, SS, et Wassif, C (1997). *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forbrain, and definitive erythrocyte development. *Development* 124, 2935-2944.

Power, JB, Chapman, JV (1985). Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In *Plant Cell Culture, A Practical Approach*, Ed by Dixon RA, pp45, IRL Press, Oxford-Washington DC.

Rabbitts, T (1990). LIM domains. *Nature* 346, 418.

Rabbitts, TH, Axelson, H, Forster, A, Grutz, G, Lavenir, I, Larson, R, Osada, H, Valge-Archer, V, Wadman, I, et Warren, A (1997). Chromosomal translocations and leukaemia : a role for Lmo2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis. *Leukemia* 11, 271-272.

Reinhard, M, Zumbunn, J, Jaquemar, D, Kuhn, M, Walter, U, et Trueb, B (1999). an alpha-actinin binding site of zyxin is essential for subcellular zyxin localization and alpha-actinin recruitment. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13410-13418.

Roof, DJ, Hayes, A, Adamian, M, Chishti, AH, et Li, T (1997). Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *Journal of Cell Biology* 138, 575-588.

Rounsley, SD, Ketchum, KA, Lin, X, Crosby, ML, Brandon, RC, Kaul, S, Mason, TM, Kerlavage, AR, Adams, MD, Somerville, CR, et Venter, JC (1998b). *Arabidopsis thaliana* chromosome II BAC F4118 genomic sequence (gene = F4118.22). GenBank Accession n° AC004665.

Rounsley, SD, Ketchum, KA, Lin, X, Phillips, CA, Brandon, RC, Fuhrmann, JL, Withe, O, Kerlavage, AR, Adams, MD, Somerville, CR, et Venter, JC (1998a). *Arabidopsis thaliana* chromosome II BAC T28M21 genomic sequence (gene = T28M21.6). GenBank Accession n° AF002109.

Sadler, I, Crawford, AW, Michelsen, JW, et Beckerle, MC (1992). Zyxin and cCRP : two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 119, 1573-1587.

Sanchez-Garcia, I, Osada, H, Forster, A, et Rabbitts, TH (1993). The cysteine-rich LIM domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1. *EMBO J.* 12, 4243-4250.

Sanchez-Garcia, I, et Rabbitts, T (1994). The LIM domain : a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *TIG* 10, 315-320.

Schlessinger, J, et Ullrich, A (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinase. *Neuron* 9, 383-391.

Schmeichel, K, et Beckerle, M (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 79, 211-219.

Schmeichel, KL, et Beckerle, MC (1997). Molecular dissection of a LIM domain. *Mol. Biol. Cell* 8, 219-230.

- Shah, DM, Hightower, RC, et Meagher, RB (1983). Genes encoding actin in higher plants : intron positions are highly conserved but the coding sequences are not. *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 111-126.
- Shawlot, W, et Behringer, R (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374, 425-430.
- Shen, WH, et Gigot, C (1997). A LIM domain-containing protein of *Nicotiana tabacum*. EMBL Database Accession n° Y11002.
- Shen, Y, Lyons, P, Cooley, M, Davidson, D, Veillette, A, Salgia, R, Griffin, JD, et Schaller, MD (2000). The non-catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase-PEST targets paxillin for dephosphorylation in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 1405-1413.
- Shen, Y, Schneider, G, Cloutier, JF, Veillette, A, et Schaller, MD (1998). Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6474-6481.
- Sheng, HZ, Zhadanov, AB, Mosinger, B, Fuji, T, Bertuzzi, S, Grinberg, A, Lee, EJ, Huang, SP, Mahon, KA, et Westphal, H (1996). Specification of pituitary cell lineage by the LIM homeobox gene *Lhx-3*. *Science* 272, 1004-1007.
- Shepherd, HS, Ledoigt, G, et Howell, SH (1983). Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein (LHCP) mRNA accumulation during the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell* 32, 99.
- Smith, DB, et Johnson, KS (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Spector, I, Braet, F, Shochet, NR, et Bubba, MR (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique* 47, 18-37.
- Stoppin, V, Vantard, M, Schmidt, AC, Lambert, AM (1994). Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly : the nuclear surface in higher plants has centrosome like activity. *Plant Cell* 6, 1099-1106.
- Stronach, BE, Renfranz, PJ, Lilly, B, et Beckerle, MC (1999). Muscle LIM proteins are associated with muscle sarcomeres and require dMEF2 for their expression during *Drosophila* myogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 10, 2329-2342.
- Stronach, BE, Siegrist, SE, et Beckerle, MC (1996). Two muscle-specific LIM proteins in *Drosophila*. *J. Cell. Biol.* 134, 1179-1195.
- Sweetman, J, Spurr, C, Eliasson, A, Gass, N, Steinmetz, A, et Twell, D (2000). Isolation and characterization of two pollen-specific LIM domain protein cDNAs from *Nicotiana tabacum*. *Sexual Plant Reprod.* in press.

Taira, M, Evrard, JL, Steinmetz, A, et Dawid, IB (1995). Classification of LIM protein. *Trends Genet.* 11, 431-432.

Taira, M, Jamrich, M, Good, PJ, et Dawid, IB (1992). The LIM domain-containing homeobox gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus gastrula* embryos. *Genes Dev* 6, 356-366.

Thor, S, et Thomas, JB (1997). The drosophila islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron.* 18, 397-409.

Traas, JA, Burgain, S, et Dumas de Vaultx, R (1989). The organization of the cytoskeleton during meiosis in eggplant (*Solanum melongena* L.) : microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. *Journal of Cell Science* 92, 541-550.

Tsui, SKW, Chan, PPK, Cheuk, CW, Liew, CC, Waye, MMY, Fung, KP, et Lee, CY (1996). A novel cDNA coding for a LIM domain protein located at human chromosome 14q32 as a candidate for leukemic translocation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 747-754.

Tu, Y, Li, F, et Wu, C (1998). NCK-2, a novel Src homology 2/3 - containing adaptor protein that interact with the LIM - only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase signaling pathway. *Molecular Biology of the Cell* 9, 3367-3382.

Tu, YZ, Li, FG, Goicoechea, S, et Wu, CY (1999). The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2425-2434.

Turner, CE (1994). Paxillin : a cytoskeletal target for tyrosine kinases. *BioEssays* 16, 47-52.

Vallenius, T, Luukko, K, et Makela, TP (2000). CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha actinin-4. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11100-11105.

Vantard, M, Peter, C, Fellous, A, Schellenbaum, P, et Lambert, AM (1994). Characterization of a 100 kDa heat-stable microtubule-associated protein from higher plants. *Eur. J. Biochem.* 220, 847-853.

Vian, A, Henry-Vian, C, Schantz, R, Ledoigt, G, Frachisse, JM, Desbiez, MO, Julien, JL (1996). Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants ? *FEBS Letter* 380, 93-96.

Visvader, JE, Mao, X, Fujiwara, Y, Hahm, K, et Orkin, SH (1997). The LIM-domain binding protein *Ldb-1* and its partner *LMO-2* act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13707-13712.

- Wada, S, Katsuyama, Y, Yasugi, S, et Saiga, H (1995). Spatially and temporally regulated expression of the LIM class homeobox gene *Hrlim* suggests multiple distinct functions in development of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Mechanisms of Development* 51, 115-126.
- Wadmann, I, Li, J, Bash, RO, Forster, A, Osada, H, Rabbitts, TH, et Baer, R (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J.* 13, 4831-4839.
- Wadmann, IA, Osada, H, Grutz, GG, Agulnick, H, Westphal, A, Forster, TH, et Rabbitts, TH (1997). The LIM-only-protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1, and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.
- Warren, AJ, Colledge, WH, Carlton, MB, Evans, MJ, et Smith, AJ (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein Rbtl2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.
- Way, JC, et Chalfie, M (1988). *mec-3*, a homeobox containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 54, 5-16.
- Weiskirchen, R, et Bister, K (1993). Suppression in transformed avian fibroblasts of a gene (*crp*) encoding a cysteine-rich protein containing LIM domains. *Oncogene* 8, 2317-2324.
- Wu, RY, Durick, K, Songyang, Z, Cantley, LC, Taylor, SS, et Gill, GN (1996). Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 15934-15941.
- Wu, RY, et Gill, GN (1994). LIM domain recognition of a tyrosine-containing tight turn. *J. Biol. Chem.* 269, 25085-25090.
- Xia, H, Winokur, ST, Kuo, ST, Altherr, MR, et Bredt, DS (1997). Actinin-associated LIM protein : identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. *Journal of Cell Biology.* 139, 507-515.
- Xue, D, Tu, Y, et Chalfie, M (1993). Cooperative interactions between the *Caenorhabditis elegans* homeoproteins UNC-86 and MEC-3. *Science* 261, 1324-1328.
- Yao, X, Perez-Alvadoro, GC, Louis, HA, Pomies, P, Hatt, C, Summers, MF, et Beckerle, MC (1999). Solution structure of the chicken cysteine-rich protein, CRP-1, a double-LIM protein implicated in muscle differentiation. *Biochemistry* 38, 5701-5713.
- Yasuhara, H, Sonobe, S, et Shibaoka, H (1992). ATP-sensitive binding to microtubules of polypeptides extracted from isolated phragmoplasts of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 33, 601-608.

Zhou, Q, Ruiz-Lozano, P, Martone, ME, et Chen, J (1999). Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 274, 19807-19813.

Zigmond, SH, Joyce, M, Yang, CS, Brown, K, Huang, MZ, et Pring, M (1998). Mechanism of cdc-42 induced actin polymerization in neutrophil extracts. *Journal of Cell Biology* 142, 1001-1012.