141515

N° d'ordre :



## Thèse de Doctorat Université des Sciences et Technologies de Lille I

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN SCIENCES Génie Enzymatique, Bioconversion, Microbiologie



Clonage et caractérisation du promoteur du gène de la nitrate réductase chez *Cichorium intybus* L. Recherche de facteurs de transcription contrôlant l'expression de la nitrate réductase en fonction de la source azotée.

par

## Jean-François Têtu

Soutenue le devant la commission :

Rambour S. Daniel-Vedèle F. Limami A. Goupil P. Michalsky J.C. Professeur, Université de Lille I Directeur de Recherches, INRA Versailles Chargé de Recherches, INRA Versailles Maître de Conférences, Université de Lille I Directeur de Recherches, CNRS Lille

Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Abréviations

## Abréviations

2,4-D	acide 2,4-dichloro-phénoxy-acétique
ABA	acide abscissique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
ANA	acide naphtyl-acétique
ANR	activité nitrate réductase
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATP	adénosine triphosphate
AuxRE	élément de réponse à l'auxine
BET	bromure d'éthidium
CaMV	virus de la mosaïque du chou-fleur
Da	dalton
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylénediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAD	flavine adénine dinucléotide
Fd	ferrédoxine
FMN	flavine mononucléotide
GOGAT	glutamine 2-oxoglutarate amino transférase
GS	glutamine synthétase
GUS	β-glucuronidase
kb	kilo base
kDa	kilo daltons
MF	matière fraîche
MS	matière sèche
МоСо	cofacteur à molybdène

MU	4-méthylumbelliférone
MUG	4-méthulumbelliféryl-β-D-glucuronide
NAD/NADH	nicotiamide adénine dinucléotide (forme oxydée / forme réduite)
NADP/NADPH	nicotiamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée / forme
	réduite)
nia	gène de la nitrate réductase
nii	gène de la nitrite réductase
NiR	nitrite réductase
NR	nitrate réductase
pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PCR-I	PCR inverse
rpm	rotations par minute
SAB	sérum albumine bovine
SDS	sodium dodécyl sulfate
Temed	N,N,N',N'- tétraméthyléthylénediamine
UV	ultra violet
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

Sommaire

## Avant propos

## Abréviations

Sommaire	page 1	
Présentati	on du sujet	page 6
Etude bib	liographique	page 8
Première pa	artie: Nitrate et nitrate reductase	page 8
I. L'assimila	ation du nitrate	page 8
II. Structur	e physico-chimique de la nitrate réductase	page 10
III. Structu	re primaire de la nitrate réductase	page 13
IV. Régulat	ion de l'assimilation du nitrate	page 15
IV. 1	. Absorption du nitrate et activité nitrate réductase	page 15
<i>IV.</i> 2	. Activité NR, métabolisme carboné et pouvoir réducteur	page 17
V. Régulati	on de la nitrate réductase	page 19
<i>V.1.</i>	Le nitrate	page 19
<i>V.2.</i>	La glutamine	page 21
<i>V.3.</i>	Les cytokinines et l'acide abscissique	page 22
<i>V.4.</i>	Les auxines	page 25
<i>V.5.</i>	La lumière	page 25
<i>V.6.</i>	Bilan des régulations	page 29
VI. Etudes	des promoteurs de gènes de nitrate réductase	page 30
B. Les facte	urs de transcription dans le règne végétal	page 34
I. Classifica	tion des facteurs de transcription	page 34
(1)	Les bZIP protéines (basic region leucine-zipper)	page 34
(2)	Les protéines bHLH (hélice-boucle-hélice)	page 35
(3)	Les protéines MYB	page 35
(4)	Les protéines « homéodomaines » (HD)	page 36
(5)	La famille des MADS-box	page 36

III. Modu	ation de l'activité des facteurs de transcription	page 41
II. Domain	es d'activation	page 40
(11	) Les protéines avec d'autres motifs	page 40
(10)	Domaine GT-1a/GT-2	page 39
(9)	Domaine AP2/EREBP	page 39
(8)	Les facteurs heat shock (HSFs)	page 39
(7)	Les protéines contenant les motifs boîte-HMG et crochet-AT	page 38
(6)	Les protéines avec un motif zinc	page 37

Matériel et Méthodes	page 43
I. Matériel Végétal	page 43
La chicorée de Bruxelles	page 43
Mise en culture	page 44
Cultures cellulaires	page 44
II. Matériel bactérien	page 44
Agrobacterium tumefaciens	page 44
Escherichia coli	page 45
III. Analyses moléculaires	page 45
Extraction de l'ADN génomique végétal	page 45
Extraction d'ADN plasmidique	page 46
Quantification de l'ADN	page 46
Transfert de l'ADN par la technique de SOUTHERN Blot	page 47
Extraction des ARN	page 48
Transfert des ARNm par la technique de NORTHERN Blot	page 48
IV. Hybridations moléculaires	page 48
Purification et marquage des sondes	page 48
Hybridation	page 48
V. PCR-Inverse	page 49
Ligature	page 49
Amplification	page 50
VI. Clonage	page 52
Principe	page 52

Ligature	page 52
Transformation des bactéries par électroporation	page 53
Transformation par choc thermique.	page 53
Sélection des recombinants	page 54
VII. Séquençage	page 55
VIII. Extraction des protéines nucléaires	page 55
IX. Retards sur gel	page 56
Préparation de la sonde	page 56
Réaction d'hybridation ADN-protéines	page 56
X. Gels protéiques	page 57
Gels bi-dimensionnels	page 57
Gels mono-dimensionnels	page 60
XI. Spectrométrie de masse	page 60
XII. Quantification de la nitrate réductase par la technique d'ELISA	page 61
Extraction non dénaturante de protéines	page 61
Test ELISA en sandwich	page 61
Calcul des quantités relatives de protéine	page 62
XII. Transformation par Agrobacterium tumefaciens	page 62
Transformation de la suspension cellulaire de Cichorium intybus	page 62
Transformation des explants de Cichorium intybus	page 63
XIV. Activité nitrate réductase et dosage de la teneur en nitrate	page 64
Dosage de la teneur en nitrate	page 64
Activité nitrate réductase	page 64
Résultats et discussion	page 66
Chapitre I: Clonage, séquençage et caractérisation du promoteur du	
gène de la nitrate réductase chez Cichorium intybus	page 66
I. Isolement du promoteur nia par PCR-I	page 66
I.1. Hybridations sur ADN génomique	page 66
I.2. Réalisation de la PCR-I	page 69
I.3. Clonage	page 70

I.3. Clonage	page 70
I.4. Séquençage	page 70
II. Analyse du promoteur nia	page 72
II.1. Analyse informatique	page 72
II.2. Séquences cibles de facteurs de transcription	page 73
III. Conclusions	page 74
Chapitre II: Analyse de la fonctionnalité du promoteur du gène <i>nia</i> cloné	page 76

Chapter II. Analyse de la fonctionnance du promoteur du gene na cione	page 10
A. Etudes sur les plantules de Cichorium intybus transformées	page 76
I. Transformation des explants cotylédonaires de chicorée	page 76
II. Etudes des plantes transformées pnia: UidA	page 77
B. Etudes sur la suspension cellulaire de Cichorium intybus transformée	page 79
I. Caractérisation de la suspension cellulaire	page 79
II. Effets du passage d'un milieu nitrate à un milieu ammonium	page 80
III. Effets du passage d'un milieu ammonium à un milieu nitrate	page 82
III.1. Dosage de nitrate endogène	page 82
III.2. Activité nitrate réductase	page 82
III.3. Quantité de protéine NR	page 83
III.4. ARNm NR	page 84
IV. Conclusions	page 85
V. Mise en place de la détection de l'activité GUS en microplaques	page 86
VI. Transformation de la suspension cellulaire de chicorée	page 88
VII. Influence de la source azotée sur la suspension cellulaire de chicorée	
transformée	page 91

## Chapitre III: Recherche de protéines pouvant intéragir avec le promoteur

I.

du gène <i>nia</i> de chicorée	page 93
I. Caractérisation de protéines accumulées de façon différentielle dans une	
suspension cellulaire de <i>Cichorium intybus</i> cultivée sur un milieu NH4 <sup>+</sup> et	
un milieu NO <sub>3</sub>	page 93
I.1. Protéines tissulaires solubles	page 93
I.2. Protéines nucléaires	page 95
I.3. Conclusions	page 98

II. Études du promoteur de la nitrate réductase de chicorée par des	
expériences de retard sur gel	page 100
II.1. Isolement des fragments de promoteur et extraction	
des protéines nucléaires	page 100
II.2. Retards sur gel	page 101
II.2.1. Fragment I (89 pb)	page 102
II.2.2. Fragment II (145 pb)	page 102
II.2.3. Fragment II (168 pb)	page 103
II.2.4. Fragment IV (225 pb)	page 104
II.2.5. Fragment V (274 pb)	page 104
II.3. Conclusions	page 105
Conclusions et Perspectives	page 106
Références Bibliographiques	page 113

Annexe

Abstract

## Présentation du sujet

## Présentation du sujet

*Cichorium intybus* est le modèle d'étude du laboratoire de Physiologie Végétales de Lille pour deux raisons importantes : l'importance économique régionale et les remarquables propriétés de morphogenèse *in vitro* (Gautheret, 1953). Ainsi l'étude de la rhizogenèse a été abordée à partir de la culture *in vitro* d'explants de racines tubérisées de *Cichorium intybus* (Bouazza, 1993 ; Vasseur *et al.*, 1986). L'étude de l'embryogenèse somatique directe a été développée à partir d'une souche hybride *C. intybus* X *C. endivia*. Des explants aussi divers que les styles, les anthères, les feuilles ou les racines permettent l'obtention d'embryons somatiques (Dubois *et al.*, 1988 ; Guédira *et al.*, 1989 ; Dubois *et al.*, 1990).

La chicorée est une plante bisannuelle, qui semée en avril - mai, développe une rosette de feuilles et une racine tubérisée qui est récoltée en septembre - octobre. Mise à l'obscurité et en conditions hydroponiques, elle produit un bourgeon étiolé aux feuilles fortement imbriquées : le chicon ou l'endive. La chicorée de Bruxelles est cultivée dans le Nord de la France (137 500 tonnes), la Belgique (100 000 tonnes) et les Pays-Bas (88 000 tonnes).

L'assimilation du nitrate commence par son transport dans la plante puis par sa réduction en nitrite catalysée par la nitrate réductase (NR). Le nitrite est ensuite réduit en ammonium grâce à la nitrite réductase (NiR). La glutamine synthétase (GS) utilise l'ammonium pour synthétiser la glutamine à partir du glutamate. Le nitrite comme l'ammonium sont des composés toxiques pour la plante et ne doivent donc pas s'accumuler. Aussi la plupart des régulations de l'assimilation du nitrate s'exercent sur le contrôle du pool de nitrate accessible (absorption et stockage vacuolaire) et sur l'activité de la nitrate réductase (ANR).

Chez la chicorée, l'ANR mesurée *in vivo* est plus importante dans la racine que dans les feuilles et ceci jusqu'à la tubérisation (Dorchies et Rambour, 1985). En dehors des légumineuses et des ligneux, chez lesquels la localisation de la réduction du nitrate dans la racine est une conséquence de la co-évolution avec la rhizosphère, les plantes d'intérêt agronomique habituellement étudiées, comme les céréales, réduisent principalement le nitrate dans les feuilles. La chicorée constitue de ce fait un cas particulier de dépendance

#### Présentation du sujet

de la réduction du nitrate vis à vis de la racine au cours des premiers stades de développement. Il faut attendre la tubérisation de la racine et l'apparition de la septième feuille pour observer le transfert des activités de réduction du nitrate vers les feuilles.

La NR est inductible par son substrat, le nitrate. On constate, chez la chicorée, que même avec des concentration élevées de nitrate, la transcription de la NR et l'ANR restent principalement racinaires (Palms, 1995).

La chicorée est une plante qui exige des conditions de nutrition azotée contrôlées. En effet, un apport de 3 mM de nitrate lors de la culture de la chicorée permet l'obtention de racines tubérisées qui donneront des chicons de bonne qualité alors qu'un apport de 6 mM produit des racines tubérisées qui aboutiront à des chicons de mauvaise qualité, dont les feuilles ne sont pas correctement imbriquées. De plus, les conditions de nutrition azotée ont une très grande influence sur les pathogènes pouvant attaquer la chicorée. En effet, l'apport important de fumure azotées induit une susceptibilité accrue à diverses infections fongiques et bactériennes (*Erwinia chrysantemii, Pseudomonas pectynolytica*). Il est donc important, d'un point de vue agronomique, de bien connaître les besoins en

azote de la chicorée et donc d'étudier son assimilation au sein de la plante.

Au laboratoire, des études ont permis d'isoler le gène codant pour la NR chez la chicorée (Palms *et al.*, 1996). La séquence comporte 5387 nucléotides et code pour une protéine de 920 aa. Cependant, la région régulatrice n'avaient pas pu être isolée.

La base du travail de thèse entrepris ici, fût d'isoler et de caractériser cette région régulatrice du gène *nia* de la chicorée afin de pouvoir entreprendre l'étude des mécanismes moléculaires de l'induction de la NR par son substrat. Dans un premier temps, nous présenterons le clonage de cette région régulatrice. Puis des tests de fonctionnalité de cette région seront entrepris par l'intermédiaire de plantes transformées avec une construction contenant un gène rapporteur *UidA* sous contrôle du promoteur *nia* cloné. Cette construction sera également introduite dans une culture cellulaire de chicorée, et l'activité GUS mesurée par une technique mise au point au cours de cette thèse. Enfin, dans un dernier chapitre, nous tenterons de mettre en évidence des régions du promoteur impliquées dans cette réponse au nitrate par liaison de protéines, éventuels facteurs de transcription. Par des analyses de gels de polyacrylamide en 2D, nous tenterons de mettre en évidence des protéines dont l'accumulation dépend de la source d'azote. Ces protéines seront également candidates pour être des facteurs de transcription.

#### Première partie : Nitrate et nitrate réductase

### I. L'assimilation du nitrate

L'azote est un élément essentiel du règne végétal. En effet, il entre dans la composition des constituants cellulaires, en particulier des acides aminés, des protéines et de la chlorophylle. Il est essentiellement puisé dans le sol par les plantes sous une forme minérale. Dans un sol, le nitrate est la source d'azote minérale de loin la plus abondante, sauf en cas d'apport massif et récent d'engrais ammoniaqué. Seules des associations actinorhizales avec des bactéries (type *Rhizobium*) permettent une assimilation de l'azote atmosphérique.

La réduction du nitrate en ammonium est très coûteuse pour la plante consommant jusqu'à 20 % de l'énergie photosynthétique (De La Torre *et al.*, 1991). De plus, l'absorption du nitrate consomme de l'ATP comme toute absorption d'anion. La réaction de réduction du nitrate en ammonium nécessite un apport de huit électrons :



La conversion du nitrate en ammonium provoque par conséquent une alcalinisation du contenu cellulaire (Dijkshoorn, 1962) induisant la mise en œuvre d'un mécanisme de régulation du pH intracellulaire (Raven et Smith, 1976).

La réduction du nitrate se fait en deux étapes dont la première est la réduction du nitrate en nitrite, catalysée par la nitrate réductase (NR), enzyme cytosolique:

NO. + NAD(P)H +  $2H^+$ NO, + NAD(P)H<sup>+</sup> + H<sub>0</sub>O

Les deux électrons nécessaires à cette réaction proviennent des nucléotides pyridiniques : NADH ou NADPH. Ainsi il existe trois types de nitrate réductase, deux chez les végétaux



Figure 1: Représentation schématique de la voie d'assimilation de l'azote dans la cellule. NR : nitrate réductase NiR : nitrite réductase GS : glutamine synthétase GOGAT : glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase

supérieurs et une chez les champignons. La première utilise le NADH comme donneur d'électrons (NR : NADH, EC 1.6.6.1), une autre utilise le NADPH (NR : NADPH, EC 1.6.6.3), enfin la dernière est une nitrate réductase bi-spécifique qui utilise soit le NADH soit le NADPH (NR : NAD(P)H, EC 1.6.6.2). La NR : NADH est la forme la plus commune chez la plupart des végétaux supérieurs et les algues. On trouve la NR : NADH dans les feuilles et la nitrate réductase bi-spécifique dans les racines. La NR : NADPH, présente chez les champignons, n'a pas encore été mise en évidence chez les plantes supérieures. Chez la chicorée de Bruxelles, la seule forme mise en évidence est une NADH : NR (Chraibi, 1988).

La seconde étape est la réduction du nitrite en ammonium; cette réaction est catalysée par la nitrite réductase (NiR, EC 1.7.7.1), enzyme plastidique. Elle requiert 6 électrons apportés par la ferrédoxine réduite (Fdred) :

$$NO_{2}^{-} + 6Fd(Fe^{2+}) + 8H^{+} \rightarrow NH_{4}^{+} + 6Fd(Fe^{3+}) + 2H_{2}O$$

Le pouvoir réducteur (Fdred) nécessaire au fonctionnement de la nitrite réductase est généré par la photosynthèse, soit directement si la réduction a lieu dans les feuilles, soit indirectement si elle a lieu dans les racines. La réduction du nitrate en nitrite a lieu dans le cytosol, puis le nitrite passe dans les plastes où il est réduit en ammonium. L'ammonium est alors assimilé en glutamine par le biais de la glutamine synthétase, enzyme plastidique (figure 1).

C'est sans doute pour des raisons de toxicité qu'il existe une co-régulation transcriptionnelle de la NR et de la NiR (Faure *et al.*, 1991). En effet le nitrite est toxique pour la plante. Le produit final de la réaction, l'ammonium, l'est également, bien qu'à un degré moindre, il sera alors directement incorporé sous forme d'acide aminé. Ainsi, l'assimilation du nitrate doit alors avoir lieu lorsque la plante a besoin d'ammonium pour la synthèse des acides aminés.



*Figure 2 : Représentation schématique de la structure et des domaines catalytiques de la nitrate réductase des végétaux supérieurs (selon Caboche et Rouzé, 1990).* 



*Figure 4: Trajet des électrons de l'accepteur initial (NAD(P)H) jusqu'au nitrate qui sera alors réduit en nitrite. Les activités partielles sont également représentées.* 

### II. Structure physico-chimique de la nitrate réductase

Bien que la caractérisation biochimique de la nitrate réductase chez les plantes supérieures soit réalisée depuis le début des années 50, la purification de l'enzyme n'a été possible qu'à partir des années 70 (Campbell et Smarelli, 1978). Ceci s'explique par la très grande instabilité de l'enzyme imposant des conditions particulières d'extraction et de purification. Les expériences *in vivo* montrent que la demi-vie de l'enzyme n'excède pas 3 à 5 heures (Li et Oaks, 1993). La protéine NR a été purifiée (par chromatographie d'affinité et électrophorèse) chez de nombreuses espèces comme le maïs, le soja, l'épinard, le tabac, l'orge.... Grâce à ces purifications, des anticorps monoclonaux ont été obtenus (Hyde *et al.*, 1989; Sueyoshi *et al.*, 1988).

La nitrate réductase des plantes supérieures est un homodimére dont chaque unité a une masse moléculaire de 100 à 120 kD (figure 2). Chaque unité contient entre 881 (chez le pois) à 926 (chez l'épinard) acides aminés (Srivastava, 1995). Chez Cichorium intybus, elle compte 920 acides aminés (Palms et al., 1996). La figure 3 représente des alignements de différentes séquences en acides aminés de NR de quelques végétaux supérieurs. Dans chaque sous-unité, les acides aminés acides sont plus abondants que les basiques: le point isoélectrique de la NR de l'orge a été estimé à 5,7 (Redinbaugh et Campbell, 1985). Il existe entre 9 et 19 résidus cystéine dans chaque sous-unité et ces deux sous-unités sont reliées entre elles par au moins trois ponts disulfure de résidus cystéine (Hoff et al., 1992). Chaque sous unité est composée de trois groupes prosthétiques: FAD, hémique (cytochrome b557) et molybdoptérique (Mo-Co). La région liante NADH/NADPH et le domaine FAD sont situés dans la partie C-terminale du polypeptide tandis que le domaine Mo-Co est localisé dans la partie N-terminale. Le domaine hémique occupe une partie centrale dans le polypeptide. Le domaine molybdoptérique est un complexe composé d'un atome Mo associé à une molécule ptérique par l'intermédiaire d'un groupement thiol. Les trois domaines du polypeptide sont apparemment liés par deux charnières: la première entre les groupes Mo-Co et le cytochrome, et la seconde entre le cytochrome et le FAD. La première charnière joue un rôle important dans la modulation de l'activité de l'enzyme par phosphorylation-déphosphorylation (Bachmann et al., 1996). Les trois régions du polypeptide peuvent être séparées par des traitements de l'enzyme par des protéases appropriées. Les trois domaines indépendants montrent des activités partielles de l'enzyme. Ces activités partielles sont de deux types (figure 4). Le premier regroupe les

Afnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard	MATSVDNRHYPTMNGVRHAFK MAASVDNRQYA-RLEPGLNGVVRSYK MAASVENRQFSHIEAGLS MAASVENRQFSHLEAGLS MAASVERRQYTHLEPGLSG MAASVDRQYHPAPMSGVVR	PPLVPSPRSFDRHRHQNQTLD PPVPGRSDSPKAHQNQTTN -RSFKPRSDSPVRGCNFP RSFKPRSDSPVRGCNFP VGRTFKPRPDSPVRGCNFPS TPFSNHRSDSPVRGYFFSN GESDWING GDSPVRGYTFSN	VILTETKIVKETE IQTVFLKP SPNSTNFQKK SPNSTNFQKK I-PPSSNGVVKP 	VITTVVDSYDDSS AKVHDDDEDVS PNSTIFLDYSS PNSTIYLDYSS QNPFIYLDYSS GEKIKLVDNNSNNNGS	S DDEDESHNRNVPYY S EDENETHNSNAVYY S EDDDDDDEK-NEYI S EDDDDDDEK-NEYI S EDEDDDDEK-NEYI NNNNRYDSDSEEDDDERK-NEYI	KELVKKS-NSDLEPSI KEMIRKS-NAELEPSV QMIKKG-NSELEPSV QMIKKG-NSELEPSV /QMIKKG-KTELEPSI KEMIKKG-NSELEPSSI
hordeum	MAASVEPROPFGRLDAPATAPTARAP **:**: :	GSNGIRRRADSPVRGCGFP *	SLISP	PRKGPVAEEEE	DDEDDE HEIN DDDEDDEG-HEDWF ::: .: :	REAYGSHLQLEVEPST
Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	LDPRDESTADSWIQRNSSMLRLTGKH LDPRDEYTADSWIERNPSMVRLTGKH HDSRDEGTADNWIERNFSLIRLTGKH HDTRDEGTADNWIERNFSLIRLTGKH VDSRDEGTADNWIERNFSLIRLTGKH FDPRDQGTADQWIERNPSMVRLTGKH RDPRDEGTADAWIERNPSLIRLTGKH	PFNAEAPLPRLMHHGFITPVF PFNSEAPLNRLMHHGFITPVF PFNSEPPLNRLMHHGFITPVF PFNSEPPLRLMHHGFITPVF PFNSEPPLRLMHHGFITPVF PFNSEPPLRLMHHGFITPDF PFNSEPPLNKLMQHGFITPAF *:*.**.**	PLHYVRNHGAVPKA PLHYVRNHGHVPKA PLHYVRNHGPVPKG PLHYVRNHGPVPKA PLHYVRNHGPVPKA PLHYVRNHGPVPNA PLHYVRNHGPVPNA PLHYVRNHGAVPRG PLHYVRNHGAVPRG	NWSDWSIEITGLVKRPAKF QWAEWTVEVTGFVKRPMKF TWDDWTVEVTGLVKRPMKF SWSDWTVEVTGLVKRPMKF KWEDWTVEVTGLVKRPIRF TWEDWTVEICGLVKRPARF DWATWTVEVTGLVRRPARL * *::*: *:*:**	TMEELISEFPSREFPVTLVCAGNRR TMDQLVSEFAYREFAATLVCAGNRR TMDQLVNEFPSRELPVTLVCAGNRR TMDQLVNEFPSREFPVTLVCAGNRR TMDQLVNEFPSREFPVTLVCAGNRR TMDQLVNEFPSREFPVTLVCAGNRR SMTQLVNEFPSREFPVTLVCAGNRR TMDELANGFPAAEVPATLVCAGNRR * ***	(EQNMVKQTIGFNWGS (EQNMVKQTIGFNWGA (EQNMVKQTIGFNWGA (EQNMVKQTIGFNWGA (EQNMVKQTIGFNWGA (EQNMTKQSIGFNWGA (EQNMTQQTVGFNWGA (EQNMVQQTVGFNWGA
Atnial Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AGVSTSLWKGIPLSEILRRCGIYSRR AGVSTSVWRGVPLCDVLRRCGIFSRK AAVSTTVWRGVPLRALLKRYGVFSKN AAVSTTIWRGVPLRALLKRCGVFSKN AAVSTSVWRGVPLRALLKRCGVSKK AGISTSVWKGVPLRDVLKRCGVMSSL AGISTSVWKGVPLVHILKRCGIYSRK AGVSTSVWRGARLRDVLLRCGVMSKK *.:**::*:* * :* * :* * :*	GGALNVCFEGAEDLPGGG GGALNVCFEGSEDLPGGAGTA KGALNVCFEGADVLPGGG KGALNVCFEGADVLPGGG KGALNVCFEGAEDLPGGG KGALNVCFEGAEDLPGGG GQALNVCFEGAEDLPGGG	GSKYGTSIKKEMA GSKYGTSIKKEPA GSKYGTSIKKEPA GSKYGTSIKKEPA GSKYGTSVKREFA GSKYGTSVKREFA GSKYGTSVKREFA	MDPARDIILAYMQNGELLT MDPSRDIILAYMQNGEYLT MDPARDIIVAYMQNGEKLA MDPARDIIVAYMQNGEKLS MDPARDIILAYMQNGEKLS MDPARDIILAYMQNGEKLS MDPSRDIILAYMQNGEPLL	PDHGFPVRVIVPGFIGGRMVKWLKRJ PDHGFPVRIIIPGFIGGRMVKWLKRJ PDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWIKRJ PDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRJ PDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRJ PDHGPVVRMIIPGFIGGRMVKWLKRJ PDHGPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRJ	II VTPQESDSYYHYKD II VTTKESDNFYHFKD II VTTQESDSYYHFKD II VTTQESDSYYHFKD VVVTQESESYYHFKD II VTTFESDNYYHYKD II VTTPESESYYHFKD VVTTAESDNYYHFKD
Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	NRVLPSLVDAELANSEAWWYKPEYII NRVLPSLVDAELADEEGWWYKPEYII NRVLPPHVDAELANTEAWWYKPEYII NRVLPPHVDAELANTEAWWYKPEYII NRVLPSHVDAELANSEAWWYKPEYII NRVLPSHVDAELANSEGWWYKPEYII NRVLPSHVDAELANSEGWWYKPEYII	NELNINSVITTPGHAEILPIN NELNINSVITTPCHEEILPIN NELNINSVITTPCHEEILPIN NELNINSVITTPCHEEILPIN NELNINSVITTPCHEEILPIN NELNVNSVITSPCHEEILPIN NELNINSVITTPCHEEILPIN	IAFTTQKPYTLKGY IAFTTQRPYTLKGY IAWTTQRPYTLRGY IAWTTQRPYTLRGY IAWTTQRPYTLRGY IAWTTQRPYTLRGY ISWTTQRPYTLRGY IAFTTQRAYTIKGY	AYSGGGKKVTRVEVTLDGG AYSGGGKKVTRVEVTLDGG SYSGGGKKVTRVEVTLDGG AYSGGGKKVTRVEVTLDGG AYSGGGKKVTRVEVTLDGG AYSGGGKKVTRVEVTMDGG AYSGGGKKTRVEVTMDGG AYSGGGKKTRVEVTLDGG	DTWSVCELDHQEKPNKYGKFWCWCFW ETWNVCALDHQEKPNKYGKFWCWCFW ETWQVCTLDHPEKPTKYGKYWCWCFW ETWSVCTLDHPEKPTKYGKYWCWCFW DTWSTCELDHQEKSKYGKFWCWCFW STWNVCTLDHKEKPTRYAKYWCWCFW ESWMLCTLDIPEKPNKYGRYWCWCFW	SLDVEVLDLLSAKDV ISLEVEVLDLLSAKEI ISLEVEVLDLLSAKEI ISLEVEVLDLLSAKEI ISLEVEVLDLLSAKEI ISLEVEVLDLLSAKEI ISLEVEVLDLLSAKEI ISVEIEVLDLLGAKEV
Atnial Atnia2 tabac1 tabac2	AVRAWDES FNTQPDKLIWNLMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKMIWNLMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNVMGMMNN	CWFRIRTNVCKPHRGEIGIVE CWFRVKTNVCKPHKGEIGIVE CWFRVKMNVCKPHKGEIGIVE CWFRVKMNVCKPHKGEIGIVE	EHPTRPGNQSGGW EHPTLPGNESGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQSGGW	MAKERQLEISSESNN-TIK MAKERHLEKSADAPP-SIKI MAKERHLEISAEAPP-TIKI MAKERHLEISAEAPQ-TIKI	CSVSSPFMNTAS-KMYSI CSVSTPFMNTTA-KMYSM CSISTPFMNTAS-KMYSM CSISTPFMNTAS-KMYSM	
tomate epinard chicorée hordeum	AVRATDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESLNTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNLMGMMNN AVRTWDQTHNTQPEKLIWNLMGMMNN	CWFRVKMNVCKPHKGEIGIVE CWFRVKTNVCKPHKGEIGIVE CWFRVKTNMCKPHKGEIGIVE CWFKIKVNVCRPHKGEIGLVE ***::: *:*:**	EHPTQPGNQSGGWI EHPTQPGNKSGGWI EHPTQPGNQSGGWI EHPTQPGNQTGGWI	MAKERHLEISAVAPP-TLK MARERHLEISDSGP-TLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::** : **	CSISTEEMMTAS-KMYSM CORONA RTASTEEMNTTS-KMYSM CORONA CSVSSEEMMTTS-LITETM COROLOG RSTSTEEMNTAGDKQETM CORONA RSTSTEEMNTAGDKQETM CORONA	
tomate epinard chicorée hordeum Atnial	AVRATDETINTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESINTQPEKLINNVMGMMNN AVRAWDETINTQPEKLINNLMGMMNN AVRTWDQTHNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKMNVCRPHKGEIGIVE CWERVKTNVCRPHKGEIGIVE CWERVKTNMCKPHKGEIGIVE CWEKIKVNVCRPHKGEIGLVE ***::: *:*:**********	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNKSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQSGGW **** ***::***	MAKERHLEISAVAPP-TLK MARERHLEISDSGPTLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::** : **	KSISTPEMNTAS-KMYSM FURCH REASTPEMNTTS-KMYSM FURCH (SVSSEEMNTTS-LTETM FURCH RSTSTPEMNTAGDKQETM FURCH (************************************	SLOAK I VIEINT (JA ADJAN I VIEINT (JA ADJAN I VIEIN
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1	AVRATDETINTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESINTQPEKLINNVMGMMNN AVRAWDETINTQPDKLINNLMGMMNN AVRTWDQTHNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKMNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNMCKPHKGEIGIVE CWEKIKVNVCRPHKGEIGLVE ***::: *:*:**:***	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNKSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQTGGW **** ***::*** TTGYTQ TTGYTQ	MAKERHLEISAVAPP-TLK MARERHLEISDSGPTLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::** : **	KSISTPEMNTAS-KMYSM KURAN RTASTPEMNTTS-KMYSM KURAN KSVSSPEMNTTS-LTETM KURAN RSTSTPEMNTAGDKQETM KURAN REK	SUSAN I VIENTIA ADAX I VIENTIA ADAX I VIENIA I VIENIA I PVRLIEKTSISHOV VPVQLVEKTSISHOV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2	AVRATDETINTQPEKLIWNVMGMMNN GVRAWDESINTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETINTQPDKLIWNLMGMMNN AVRTWDQTHNTQPEKLIWNLMGMMNN .**: *:: ****:*	CWERVKMNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNMCKPHKGEIGIVE CWEKIKVNVCRPHKGEIGLVE	TEH PTQPGNQSGGW TEH PTQPGNKSGGW TEH PTQPGNQSGGW TEH PTQPGNQSGGW ***** ***::*** TTGTGTGT TTGTGTGT TTGTGTGT	MAKERHLEISAVAPP-TLK MARERHLEISDSGPTLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLEISELAHPTLK **::::** : **	KSISTPEMNTAS-KMYSM KURAN RTASTPEMNTTS-KMYSM KURAN KSVSSPEMNTTS-LTETM KURAN RSTSTPEMNTAGDKQETM KURAN REK	SUSAN I VIENTIA ADIAN I VIENTIA ADIAN I VIENTIA I I VIENIA I PVRLIEKTSISHDV VPVQLVEKTSISHDV I PCKLIDKQSISPDY I PCKLIDKOSISHDV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac1 tabac2 tomate	AVRATDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESLNTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNLMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKTNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNMCKPHKGEIGLVE CWEKIKVNVCRPHKGEIGLVE	TEH PTQPGNQSGW TEH PTQPGNKSGGW TEH PTQPGNQSGGW TEH PTQPGNQTGGW TEH PTQPGNQTGGW TEH TTQPGNQTGGW TEH TTQ TTQTTG TTQTTG	MAKERHILEISAVAPP-TLKI MARERHILEISDSGPTLKI MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLKI **::::** : **	CS LST PEMMTAS-KMYSM KUNNING TAST PEMMTTS-KMYSM KUNNING CSVSS PEMMTTS-LTFTM CVALUE RSTST PEMMTAGD KQ FTM EVENING REK REK - CONTRACTOR REK - REK	SUSAN I VIENTIA ADAN I VIENTIA ADAN I VIENTIA I VIENIA I VIELIEKTSISHDV VPVQLVEKTSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLIDKQSISHDV
tomate epinard chicorée hordeum Atnial Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard	AVRATDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESLNTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINKCKPHKGEIGLVE CWERVKINVCRPHKGEIGLVE	TEHPTQPGNQSGW TEHPTQPGNKSGGW TEHPTQPGNQTGGW TEHPTQPGNQTGGW TEHPTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQSGW	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHLEISDSGPTLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::** : **	CS LST PEMMTAS-KMYSM KUNNIN VTAST PEMMTTS-KMYSM KUNNIN SVSS PEMMTTS-LITYM KUNNIN STST PEMMTAGD KQETM EVENIN REK - REK - REK - REK - REK - REK - REK	SUSAN I VIENTIA ADAN I VIENTIA ADAN I VIENI I VIENI I VIELIEKTSISHOV VEVQLVEKTSISHOV I PCKLIDKQSISHOV I PCKLIDKQSISHOV I PCKLIEKVSLSHOV
tomate epinard chicorée hordeum Atnial Atnia2 tabac1 tabac2 tabac2 tomate epinard chicorée	AVRATDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESLNTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNLMGMMNN .**: *:: ****:*:***********************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGLVE CWERVKINVCRPHKGEIGLVE	TEHPTQPGNQSGW TEHPTQPGNKSGGW TEHPTQPGNQTGGW TEHPTQPGNQTGGW TEHPTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TEHTTQPGNQTGGW TTGTTG TTGTTG TTGTTG TTGTTG	MAKERHILFISAVAPP-TLK MARERHLEISDSGPTLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::** : **	CS LST PEMMTTS-KMYSM KONGON VTAST PEMMTTS-KMYSM KONGON SVSS PEMMTTS-LTFYM KONGON STST PEMMTAGD KQ FTM EVIDENCE REK REK - REK - REK - REK - REK - REK - REK - REK - REK	SUSAN I VIENTIA ADAN I VIENI BUTTA ADAN I VIENI BUTTA I DANI VIENI BUTTA DANI VIENI BUTTA DANI VIENI BUTTA DANI VIENI BUTTA I PURLIEKTSISHOV I PURLIEKUSISHOV I PURLIEKUSISHOV I PURLIEKUSISHOV I PURLIEKUSISHOV I PURLISKUSISHOV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AVRATDETINTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESINTQPEKLINNVMGMMNN AVRAWDETINTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ****:*:***********************	CWERVKMVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNVCKPHKGEIGIVE CWERVKTNVCKPHKGEIGIVE CWERIKVNVCRPHKGEIGIVE	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNKSGGW EHPTQPGNQSGGW **** THYTQPGNQTGGW **** TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT TTYTT	MAKERHLEISAVAPP-TLK MAREKHLEISDSGP-TLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::**:	KSISTPEMMTAS-KMYSM VTASTPEMNTTS-KMYSM KSVSSEMNTTS-LTETM SSTSTPEMNTAGDKQETM REK REK REK REK REK REK REK REK REK REK	BUSAN I VIENTIA ADIAN I SCHARTTA EDANI SCHARTT EDANI VIENT DAVI SCHARTT DAVI SCHARTT EDANI VIENT EDANI VIENT SCHUT EDANI DOCKLEKTSISHDV I POKLIEKUSISHDV I POKLIEKUSISHDV VPORLUDIKELSHDV VPORLUDIKELSHDV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1	AVRATDETINTQPEKLINNVMGMMNN GVRAWDESINTQPEKLINNVMGMMNN AVRAWDETINTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ****:*************************	CWERVERNVCKPHKGEIGIVE CWERVERNVCKPHKGEIGIVE CWERVERNMCKPHKGEIGIVE CWERIEVNVCRPHKGEIGLVE ***::: *:*:*:*:***********************	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNKSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQTGGW THYTY TTGTG TGGTS TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT	MAKERHLEISAVAPP-TLK MAREKHLEISDSGP-TLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::**: **	KS LET PEMNTAS - KMYSM VTAST PEMNTTS - KMYSM KSVSS PEMNTTS - LT FTM STST PEMNTAGDKQETM REK REK REK REK REK REK REK REK	BISIAN I VIENTI A ADIAN I SCHARTINA ADIAN I SCHARTINA I DIANI SCHARTIN I DIANI VIENTI SCHERTSISHDV VPVQLVEKTSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLISKTSVSHDV VPCRLVDKKELSHDV I PCKLISKTSVSHDV VPCRLVDKKELSHDV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2	AVRATDET LNTQPEKL LWNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL LWNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL LWNLMGMMNN .**: *:: *:: ****:*********************	CWERVKENVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGIVE CWERVEKVNVCRPHKGEIGLVE SALADDAARSSEPHELE SALADDAARSSEP	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNKSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQTGGW THOTAL TTGTC TTG	MAKERHILEISAVAPP-TLK MAREKHLEISSEGA-TLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARQKHLETAEAAAP-GLK **::::**: HPRFPNGGLMSQHLDSLPIG HPRFPNGGLMSQHLDSLPIG	KS LST PEMNTAS - KMYSM VTAST PEMNTTS - KMYSM KSVSS PEMNTTS - LTFTM SSTST PEMNTAGDKQETM REK REK REK REK REK REK REK REK	BERNAL I VIENTIA ADIANI SOLENCINA ADIANI SOLENCINA I DIANI SOLENCINA I PORLIEKTSISHDV I PORLIEKTSISHDV I PORLIEKTSISHDV I PORLIEKOSISHDV I PORLIEKVSLSHDV I PORLIEKTSVSHDV VPORLVDKKELSHDV I PORLIEKTSVSHDV VPORLVDKKELSHDV I PORLIEKTSVSHDV VPORLVDKKELSHDV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1	AVRATDET LNTQPEKL LWNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL LWNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL LWNLMGMMNN .**: *:: *:: ****:*********************	CWERVKENVCKPHKGEIGIVE CWERVKENVCKPHKGEIGIVE CWERVKENVCKPHKGEIGIVE CWERVEKVNVCRPHKGEIGLVE SALADDAARSSEPHGEIGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNGUNG	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQTGGW THOTA TTGTC TTGT	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDEGTIK MARCKHIEISSELAHPTIK MARCKHIETAEAAAP-GIK **::::**: HPREPNGGLMSQHLDSLPIC HPREPNGGLMSQHLDSLPIC HFREPNGGLMSQYLDSLPIC	KS LST PEMNTAS - KMYSM VTAST PEMNTTS - KMYSM SSTST PEMNTTS - LTFTM SSTST PEMNTAGDKQETM REK REK REK REK REK REK REK REK	BERNAL I VHENT I A ADIAN I VHENT I A ADIAN I VHENT I AUTO I I I ANT VHENT I AUTO I I I ANT VHENT I AUTO I I I I I I I I I I I I I I I I I I I
tomate epinard chicorée hordeum Atnial Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac1 tabac2 tabac1	AVRATDET LNTQPEKL UNIVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL UNIVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL UNIVMGMMNN AVRTWOOT HNTQPEKL UNILMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGIVE CWERVEKVNVCRPHKGEIGIVE SALADERAFISSENDER ISLE SALADERAFISSENDER ISLE SALADER ISLE SALADERAFISSENDER ISLE SALADER ISLE	EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQSGGW **** TTGTQPGNQTGGW **** TTGTQPGNQTGGW **** TTGTQ TTGQ TTGQ TTGTQ TTGQ	MAKERHILEISAVAPP-TLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARCKHLETSELAHPTLK MARCKHLETAEAAAP-GLK **::::**: HPRFPNGGLMSQHLDSLPI HPRFPNGGLMSQYLDSLPI HPFFPNGGQMSQYLDSLPI HPFFPNGGQMSQYLDSLPI	KS LST PEMNTAS - KMYSM - KARAMA RTAST PEMNTTS - KMYSM - KARAMA SSTST PEMNTTS - LTFTM - KARAMA SSTST PEMNTAGDKQETIM - KARAMA REK - REK -	GISTAN I VHEMITTI A ADSAN I VHEMITTI TEDAXI VHEMITTI TEDAXI VHEMITTI STITTI ANTONIA IPVRLIEKTSISHDV UPVLVEKTSISHDV IPCRLIDKQSISHDV IPCRLIDKQSISHDV IPCRLIEKTSVSLSHDV IPCRLISKTSVHDV VPCRLVDKQSISHDV IPCRLISKTSVHDV VPCRLVDKKELSHDV I************************************
tomate epinard chicorée hordeum Atnial Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia2 tabac1 tabac1 tabac2 tabac1 tabac2 tabac2 tabac1	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINWCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGIVE CWERTKVNVCRPHKGEIGIVE SAIMUTAANSCOPPETIAL	EHPTQPGNQSGW EHPTQPGNKSGGW EHPTQPGNQSGGW EHPTQPGNQTGGW TTGTC	MAKERHILEISAVAPP-TLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARCKHLEISSELAHPTLK MARCKHLETAEAAAP-GLK **::::**: HPRFPNGGLMSQHLDSLPI HPRFPNGGLMSQYLDSLPI HPFFPNGGCMSQYLDSLPI HPFFPNGGCMSQYLDSLPI HPFFPNGGCMSQHLDSLPI	SSISTPEMMTAS-KMYSM KARAMA RTASTPEMMTAS-KMYSM KARAMA SSTSTPEMMTAGDKQETM EVENING SSTSTPEMMTAGDKQETM EVENING REK REK - REK - RE	GISTAN I SYNEMISTIC A ADSAN I SYNEMISTIC TEDAXI SYNEMISTIC TEDAXI SYNEMISTIC SYNEMISTI
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac1 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée comate epinard	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCRPHKGEIGLVE ***::: *:*:***************************	TH PTQPGNQSGW TH PTQPGNKSGGW TH PTQPGNQSGGW TH PTQPGNQTGGW TTGTS T	MAKERHILEISAVAPP-TLK MAREKHIEISSELAHPTIK MARCKHIEISSELAHPTIK MARCKHIETAEAAAP-GIK **::::**: HPRFPNGGLMSQHLDSLPI HPRFPNGGCMSQYLDSLPI HPFFPNGGGMSQHLDSLPI HPFFPNGGGMSQHLDSLPI HPFFPNGGGMSQHLDSLPI	SS LST PEMNTAS-KMYSM KARAN VIAST PEMNTTS-KMYSM KARAN SSVSS PEMNTTS-LTFTM KARAN SSTST PEMNTAGDKQETIM KARAN REK REK - REK - REK	GISTAN I VHEMITTI A ADJAN I VHEMITTI I DANI VHEMITTI I DANI VHEMITTI I DANI VHEMITTI I PORTISISHDV VPVQLVERTSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLIDKVSLSHDV I PCKLISKTSVSHDV VPCRLVDKKELSHDV I PCKLISKTSVSHDV VPCRLVDKKELSHDV I PCKLISKTSVSHDV VPCRLVDKKELSHDV I PCKLARKSAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	TH PTQPGNQSGW "EH PTQPGNKSGGW "EH PTQPGNQSGGW "EH PTQPGNQTGGW "TH TTQPGNQTGGW "TTGTT" "	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTLK MAREKHILEISSELAHPTIK MARQKHLETAEAAAP-GIK **::::**: HPRFPNGGLMSQHLDSLPIC HPRFPNGGCMSQYLDSLPIC HPFFPNGGCMSQYLDSLPIC HPFFPNGGCMSQHLDSLPIC HPFFPNGGCMSQHLDSLPIC HPFFPNGGCMSQHLDSLSIC	SG LST PEMMTAS-KMYSM KARAN WAST PEMMTTS-KMYSM KARAN SVSS PEMMTTS-LTFTM CAREND STST PEMMTAGD&QFTM CAREND STST PEMMTAGD&QFTM CAREND REF REF REF REF REF STLEN STATES	GISTAN I VHEALTS I ADSAN I VHEALTS I ADSAN I VHEALTS I I DIAN I VHEALTS I I PVRL I EKTS I SHDV VPVQL VEKTS I SHDV I PCKL I DKQS I SPDV I PCKL I DKQS I SHDV I PCKL I DKQS I SHDV VPCRL VDKQS I SHDV I PCKL I DKQS I SHDV I PCKL I SKTSVSHDV VPCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VPCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VPCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL VDKKELSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL V SKTSVSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL V SKTSVSHDV I PCKL I SKTSVSHDV VCRL V SKTSVSHDV V SKTSVSHDV V SKTSVSHDV V SKTSVSHDV V SKTSVSHDV V SKTSVSHDV V SKTSVSHDV
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGLVE ***:::*:*:***************************	TH PTQPGNQSGW "EH PTQPGNKSGGW "EH PTQPGNQTGGW "EH PTQPGNQTGGW "TH TTQPGNQTGGW "TTGTT" TTGTT" TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TTGTT" "TGT	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTLK MAREKHIEISSELAHPTIK MARQKHIETAEAAAP-GIK **::::**: HPRFPNGGLMSQHLDSLPIC HPRFPNGGLMSQYLDSLQL HPRFPNGGQMSQYLDSLQL HPFFPNGGQMSQYLDSLQL HPFFPNGGUMSQHLDSLSL HPFFPNGGUMSQHLDSLSL HPFFPNGGIMSQHLDSLSL AKEGWSYSTGFITEAM	SEISTPEFMETAS-KMYSM KORONA VTASTPEMETTS-KMYSM KORONA SVSSPEMETTS-KMYSM KORONA STSTPEMETTS-KMYSM KORONA STSTPEMETAGDRQFTM EVENDED STSTPEMETAGDRQFTM EVENDED REK REK 	GISTAN I VHEATTIA ADSAN I VHEATTIA ADSAN I VHEATTIA IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia1 Atnia1	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGLVE CWERVKINVCRPHKGEIGLVE ***::: *:*****************************	TH PTQPGNQSGW "EH PTQPGNKSGGW "EH PTQPGNQTGGW "EH PTQPGNQTGGW "TH TTQPGNQTGGW "TH TTQPGNQTGW "TH TTQ	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTLK MAREKHIEISSELAHPTIK MARCKHIETAEAAAP-GIK **::::**: ** HPRFPNGGLMSQHLDSLPIC HPRFPNGGLMSQYLDSLPIC HPFFPNGGCMSQYLDSLDIC HPFFPNGGCMSQHLDSLPIC HPFFPNGGCMSQHLDSLSLC EPFFPNGGCMSQHLDSLSL AKEGWSYSTGFITEAVI AKEGWSYSTGFITEAVI	SEIST PEMMTTS-KMYSM KARAN RTAST PEMMTTS-KMYSM KARAN SVSS PEMMTTS-KMYSM KARAN SSTST PEMMTAGD KQETM EVALUATE STST PEMMTAGD KQETM EVALUATE REK REK REK 	GISTAN I VIENT (I A ADJAN I VIENT INCINA ADJAN I VIENT INCINA ADJAN I VIENT INCINA I PORT I CONTRACTOR I PORT I CONTRACTOR I PORT I CONTRACTOR I PORT I EKYSLENDY I P
tomate epinard ahicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE CWERVKINVCRPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	TH PTQPGNQSGGW TEH PTQPGNKSGGW TEH PTQPGNQTGGW TH PTQPGNQTGGW TTGTT	MAKERHILEISBAVAPP-TLK MARERHILEISBISGPTLK MAREKHLEISSELAHPTLK MARCKHLEISSELAHPTLK MARCKHLEISSELAHPTLK **::::**: ** ** ** ** ** ** ** ** ** **	CS LST PEMMTTAS - KMYSM (Solorida) 20 AST PEMMTTS - KMYSM (Solorida) CSVSS PEMMTTS - LTFYM (Solorida) 20 ST ST PEMMTTAGD KQ FTM (Solorida) 20 ST ST PEMMTAGD KG SOLORIda) 20 ST ST ST SOLORIda) 20 ST S	GISTAN I VIENT (I A ADJAN I VIENT (I A ADJAN I VIENT) I DIAN I VIENT (I T I VIENT (I T I VIENT (I T I VIENT (I T I VIENT (I VIENT (I T I VIENT (I T I VIENT (I VIENT (I VIENT (I T I VIENT (I V
tomate epinard shicorée hordeum Atnial Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard shicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac2 tomate epinard shicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac2 tomate epinard shicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac2 tomate epinard shicorée	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNLMGMMNN 	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINMCKPHKGEIGLVE CWERVKINMCKPHKGEIGLVE ***:::*:*:***************************	TH PTQPGNQSGGW TEH PTQPGNQSGGW TEH PTQPGNQTGGW TH PTQPGNQTGGW TH TQPGNQTGGW TTGTT	MAKERHILEISBAGH-TLK MARERHILEISBLAHPTLK MARCHILEISSLAHPTLK MARCHILEISSLAHPTLK MARCHILEISSLAHPTLK MARCHILEISSLAHPTLK MARCHILEISSLAHPTLK MARCHILEISSLAHPTL **:::********************************	CS LST PEMNTAS-KMYSM EXPREM TAST PEMNTTS-KMYSM EXPREM CSVSS PEMNTTS-LTFYM EXPREM SSTST PEMNTAGD KQ FTM EXPREM REK REK REK REK REK REK REK REK REK REK	GISTAN I SYNENTY A ADSAN I SYNENYTY TEDAXI SYNENYTY TEDAXI SYNENYTY SYNENY SYNENYTY SYNENY SYNENYTY SYNENY
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1	AVRATDET LNTQPEKL INNVMGMMNN GVRAWDES LNTQPEKL INNVMGMMNN AVRAWDET LNTQPEKL INNVMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINCKPHKGEIGIVE CWERVKINCKPHKGEIGLVE ***:::*:*:***************************	TH PTQPGNQSGGW "EH PTQPGNKSGGW "EH PTQPGNQSGGW "EH PTQPGNQSGGW "EH PTQPGNQSGGW "EH PTQPGNQSGGW "EH PTQPGNQTGGW "EH PTQPGNQTGGW "EH PTQPGNQTGGW "EH PTQPGNQTGGW "FELVVKTY FKGV "FELVVKTY FKGV] "FELVVKTY FKGV "FELVVKTY FKGV] "FELVVKTY FKGV] "F	MAKERHILEISAVAPP-TLK MAREKHIEISSELAHPTIK MARCKHIEISSELAHPTIK MARCKHIETAEAAAP-GIK **::::**: ** HPRFPNGGLMSQHLDSLPI HPRFPNGGLMSQYLDSLPI HPRFPNGGCMSQYLDSLQL HPKFPNGGCMSQYLDSLQL HPKFPNGGCMSQHLDSLPI HPFFPNGGUMSQHLDSLSI = AKEGWSYSTGFITEAU AKEGWSYSTGFITEAU AKEGWSYSTGFITEAI S IKEGWSYSTGFITEAI S IKEGWSYSTGFITEAI S IREGWKYSEGFITEAI S IREGWKYSEGFITEAI S IREGWKYSEGFITEAI	KS LST PEMNTAS-KMYSM KARANA VTAST PEMNTTS-KMYSM KARANA SVSS PEMNTTS-LTETM KARANA STST PEMNTAGDKQETM KARANA STST PEMNTAGDKQETM KARANA STST PEMNTAGDKQETM KARANA STST PEMNTAGDKQETM KARANA REK REK REK PEK PEK PEK PEK PEK PEK PEK PEK PEK P	GIGAN I VHENTYI A ADAN I VHENTYI A ADAN I VHENTYI TEDAWI VHENTD IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
tomate epinard atnia1 Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AVRAYDETLNTQPEKLIWNVMGMMNN GVRAWDESLNTQPEKLIWNVMGMMNN AVRAWDETLNTQPEKLIWNLMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE CWERVKINVCRPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNKSGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "FILTON" "FILTON" "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKTYFKGV "FELVKVYVQES- I PERVKVYVQES- I PERVKVYVQES- FRDRVKVYVQES- FRDRVKVYVQES- FRDRVKVYVQES- FRDRVKVYVQES- PEDRVKVYVQES- PEDRVKVYVQES- PEDRVKVYVQES- PEDRVKVYVQES- I PERVKVYVQES- I PERVKVYVQES- PEDRVKVYVX- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYVS- PEDRVKVYS- PEDRVKVS- PEDRVKVS- PEDRVKVYS- PEDRVKVYS- PEDRVKVS- PEDRVKVS- PED	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTIK MARERHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MEREPNGGLMSQHLDSLPIC HPREPNGGUMSQHLDSLPIC HPREPNGGUMSQHLDSLSL HPREPNGGUMSQHLDSLSL HPREPNGGUMSQHLDSLSL HPREPNGGUMSQHLDSLSL FFFEPNGGUMSQHLDSLSL MEREPNGGUMSQHLDSLSL AKEGWAYSTGFISEAII SAKEGWAYSTGFISEAII SIKEGWAYSTGFISEAII SIKEGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII SIREGWAYSTGFISEAII	<pre>SIT PEMMITIS - KMYSM EXPENSION TAST PEMMITIS - KMYSM EXPENSION SVSS PEMMITIS - LIFTIM EVENCE STST PEMMITIS - LIFTIM EVENCE REK - REK - REK</pre>	GISTAN I VIENT (I A ADEAN I VIENT INCINA ADEAN I VIENT INCINA ADEAN I VIENT INCINA I PORT I DECEMBER UPORT I DECEMBER I PORT I DECEMBER UPORT I DECEMBER I PORT I DECEMBER I DECEMBER I PORT I DECEMBER I PORT I DECEMBER I PORT I DECEMBER I DECEMBER I DECEMBER I PORT I DECEMBER I D
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1	AVRANDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRANDESLNTQPEKLINNVMGMMNN AVRANDETLNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ****:*************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGLVE ***:::*:*:***************************	"EH PTQPGNQSGGW" "EH PTQPGNKSGGW" "EH PTQPGNQSGGW" "EH PTQPGNQTGGW" "EH PTQPGNQTGGW" "TH TTQPGNQTGGW" "TTGTT" "TGT	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTIK MARERHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAHPTIK MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MERPPNGGUMSQHLDSLEIG HPREPNGGUMSQHLDSLEIG HPREPNGGUMSQHLDSLEIG HPREPNGGUMSQHLDSLEIG HPREPNGGUMSQHLDSLEIG HPREPNGGUMSQHLDSLEIG MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSEL MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSEL MARCHILEISSELAHPILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELEISE MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELEISELEISSEL MARCHILEISSELAHPILEISSELAH MARCHILEISSELAHPILEISSELEISEL MARCHILEISSELAHPILEISSEL MARCHILEISSELAHPILEISSELEISE MARCHILEISSELAHPILEISSELEISELEISELEISELEISELEISELEISELE	<pre>SIT PEMMITIS - KMYSM EXPENSION TAST PEMMITIS - KMYSM EXPENSION SVSS PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION REK REK - REK - REK</pre>	GISIAN I VIENT (I A ADAN I VIENT (I A ADAN I VIENT (I A ADAN I VIENT) I I I I EKTSISHDV UPVLIEKTSISHDV UPVLIEKTSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLAKLAKAG KEKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRARLAMICGGS I I I I I I I I I I I I I I I I I I I
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AVRANDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRANDESLNTQPEKLINNVMGMMNN AVRANDETLNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ******************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE CWERVKINVCRPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNKSGGW "EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNQTGGW "THTQPGNQTGGW "THTQPGNQTGGW "THTQPGNQTGGW "THTQPGNQTGGW "THTT" "TH	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTIK MARERHILEISSELAHPTIK MARCKHLEISSELAHPTIK **::::**: ** ** ** ** ** ** ** ** ** **	<pre>SIT PEMMITIS - KMYSM EXPENSION TAST PEMMITIS - KMYSM EXPENSION SVSS PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION REFERENCE STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION REFERENCE REFERENCE REFERENCE REFERENCE - REFERENCE REFERENCE - REFERENCE - STLEIKEPLGHIEYQGKGNFLUNG - STLEI</pre>	GISIAN I VIENTYI A ADAN I VIENTYI A ADAN I VIENTYI A ADAN I VIENTYI I I I I I I I I I I I I I I I I I I I
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2	AVRANDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRANDESLNTQPEKLINNVMGMMNN AVRANDETLNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ****:*************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNKSGGW "EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNQTGGW "THTQPGNQTGGW "THTTQPGNQTGGW "THTTQPGNQTGGW "THTTG" "	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTIK MAREKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAH PREPNGGUMSQHLDSLPIC HPREPNGGUMSQHLDSLSL MEREPNGGUMSQHLDSLSL HPREPNGGUMSQHLDSLSL HPREPNGGUMSQHLDSLSL FFFEPNGGUMSQHLDSLSL MARCHING MARCHING MAR	<pre>SIT PEMMITIS - KMYSM EXPENSION TAST PEMMITIS - KMYSM EXPENSION SVSS PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION STST PEMMITIS - LIFTIM EXPENSION REK - REK - REK</pre>	GISIAN I VIENT (IA ADAN I VIENT (IA ADAN I VIENT (IA ADAN I VIENT) IIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tabac3	AVRANDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRANDESLNTQPEKLINNVMGMMNN AVRANDETLNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ****:*************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNKSGGW "EHPTQPGNQTGGW "EHPTQPGNQTGGW "THTQTGNQTGGW "THTTC" TTGTTC" "TTGTTC"	MAKERHILEISAVAPP-TLK MARERHILEISDSGPTIK MAREKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK MARCKHILEISSEJAHPTIK HPREPNGGUMSQHLDSLEPT HPREPNGGUMSQHLDSLEPT HPREPNGGUMSQHLDSLEJU HPREPNGGUMSQHLDSLEJU HPREPNGGUMSQHLDSLEJU AKEGWSYSTGFITEATI SAKEGWSYSTGFITEATI SIKEGWKYSTGFITEATI SIKEGWKYSTGFITEATI SIREGWKYSTGFITEATI SIREGWKYSTGFITEATI SIREGWKYSTGFITEATI SIREGWKYSTGFITEATI SIREGWKYSTGFITEATI	<pre>SIT PEMMITIS - KMYSM EXAMINE TAST PEMMITIS - KMYSM EXAMINE SYSS PEMMITIS - LIFTIM EXAMINE SSTST PEMMITIS - LIFTIM EXAMINE STIST PEMMITIS - LIFTIM EXAMINE STIST PEMMITIS - LIFTIM EXAMINE REK - REK - R</pre>	GISIAN I VIENTIA ADAN I VIENTIA ADAN I VIENTIA I I I I I I VIENTIA I PVRLIEKTSISHDV UPVLVEKTSISHDV I PCKLIDKQSISHDV I PCKLAKUSHDA GERAKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQKFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMIAGGT KQRFAKKLAMISGT XQPNLEKMQYDIKE AVQPNLEKMQYDIKE AVQPNLEKMGYDIKE AVQPNLEKMGYDIKE AND PNLEKMGYDIKE AND PNLEKMGYDIKE
tomate epinard athicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac1 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum Atnia1 Atnia2 tabac2 tomate epinard chicorée hordeum	AVRANDETLNTQPEKLINNVMGMMNN GVRANDESLNTQPEKLINNVMGMMNN AVRANDETLNTQPEKLINNLMGMMNN .**: *:: ****:*************************	CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGIVE CWERVKINVCKPHKGEIGUVE ***:::*:*:***************************	EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNKSGGW "EHPTQPGNQSGGW "EHPTQPGNQTGGW "THTQTGNQTGGW "TTGTT" TTGTT" "TTGTT"	MAKERHILEISBUSGPTIK MARERHILEISBUSGPTIK MAREKHILEISBUSGPTIK MAREKHILEISBUSGPTIK MAREKHILEISBUSGP **::::**: *** *** *** *** *** *** *** *	<pre>SI ST PEMMTAS - KMYSM EXAMINE TAST PEMMTTS - KMYSM EXAMINE SVSS PEMMTTS - LTFYM EXAMINE STST PEMMTAGDKQETM EXAMINE STST PEMMTAGDKQETM EXAMINE STST PEMMTAGDKQETM EXAMINE REK </pre>	GISIAN I VIENTSIA ADAN I VIENTSIA ADAN I VIENTSIA ADAN I VIENTSIA ELENNI VIENTSIA UVENT UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLIEKTSIA UPCKLANNAGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOKFAKKLAMIAGGT KOVPNLEKMGYDIKE AVOPNLEKMGYDIKE AVOPNLEKMGYDIKE ANDELEKMGYDIKE ANDELEKMGYDIKE ANDELEKMGYDIKE ANDELEKMGYDIKE

Figure 3:

Alignements des séquences en acides aminés de différentes nitrate réductases de végétaux supérieurs. Les alignements ont été effectués à l'aide du programme CLUSTALW sur Internet. En rouge : la région N-terminale, en noir la charnière 1, en gris la charnière 2, en bleu la région molybdique, en jaune la région hémique et en vert la région flavinique. \* acides aminés parfaitement conservés : acides aminés bien conservés. activités diaphorase ou NADH déshydrogénase qui transfèrent les électrons du NADH à des récepteurs artificiels tels que le cytochrome c ou le ferricyanure. Le second type regroupe les activités partielles terminales qui catalysent la réduction du nitrate grâce à des donneurs artificiels d'électrons comme le méthylviologène, le bleu de bromophénol et la flavine nucléotide (FMNH2). La détection des activités partielles combinée à l'immunodétection de la protéine NR ont servi de base pour classer en quatre groupes les mutants *nia*, affectés dans le gène de structure de la NR (Chérel *et al.*, 1990). L'ensemble des caractéristiques des différentes classes de mutants NR est regroupé dans la figure 5. Le premier groupe comprend les mutants n'ayant pas de protéine NR immunologiquement détectable. Le second et le troisième groupe sont affectés respectivement dans les domaines FAD et à Mo-Co. Le second groupe possède une protéine détectable et une activité NR terminale alors que le troisième se caractérise par une activité NADH déshydrogénase. Le quatrième groupe est affecté dans le domaine à hème mais conserve l'activité partielle utilisant le bleu de bromophénol comme substrat, la protéine NR est immunologiquement indétectable.

Présence de protéine NR (test ELISA)	Test -	Test +	Test +	Test -
Activités partielles associées	NADH:CR - MV:NR - FMN:NR - BP:NR -	NADH:CR - MV:NR + FMN:NR + BP:NR +	NADH:CR + MV:NR - FMN:NR - BP:NR -	NADH:CR - MV:NR - FMN:NR - BP:NR +
Localisation prédite des domaines mutés en hachuré (en gris:protéine absente)	FAD MoCo	HWHH MoCo	FAD MoCo	FAD MoCo
Classe de mutant	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Complémente avec	Aucune des autres classes	Classes 3 et 4	Classes 2 et 4	Classe 2 et 3

Figure 5: Tableau de classification des mutants nia chez Nicotiana pblumbaginifolia ainsi que les activités partielles associées (d'après Rouzé et Caboche, 1992).

De récentes études en trois dimensions sur la structure de la NR viennent de montrer qu'on peut parler de cinq domaines: molybdoptérique, l'interphase du dimère, le cytochrome b (Cb), le FAD et le NADDH. Quand les domaines FAD et NADH sont combinés, le fragment cytochrome b5 réductase (CbR) est formé; et quand le domaine Cb est joint au domaine CbR, on parle de fragment cytochrome c réductase (CcR) comme le montre la figure 6.



*Figure 6: Représentation des domaines catalytiques de la nitrate réductase des végétaux supérieurs, selon Campbell, 1999.* 

Le donneur d'électrons impliqué dans la réduction du nitrate en nitrite est le NADH. L'enzyme bispécifique NAD(P)H utilise aussi bien le NADH que le NADPH, avec cependant une préférence pour le NADPH. L'accepteur initial d'électrons du NADH/NADPH est le groupement FAD de l'enzyme. Ensuite, les électrons circulent à travers le cytochrome b557 jusqu'au site molybdoptérique de l'enzyme pour arriver en dernier lieu au nitrate qui sera réduit en nitrite (figure 4).

La cartographie des sites actifs de l'enzyme a été effectuée en utilisant des inhibiteurs enzymatiques appropriés. Une histidine (Baijal et Sane, 1988), une arginine et une lysine (Sato *et al.*, 1992) sont impliquées dans la liaison de l'enzyme avec le NADH. Des différences dans les séquences d'acides aminés entre la forme bispécifique NAD(P)H:NR de bouleau (*Betula pendula*) et celles de la forme mono-spécifique NADH:NR de nombreuses espèces ont été mises en évidences au niveau du domaine FAD de l'enzyme (Schondorf et Hachtel, 1995). Des résidus arginine sont impliqués dans les fonctions catalytiques des domaines FAD et Mo-Co (Baijal et Sane, 1988). La cystéine semble également participer de façon active au transfert d'électrons. Dwivedi *et al.* (1994)

Espèce et type d'organe	Clone	Caractéristiques	Références
NADH : NR		······································	
Arabidopsis thaliana		3829 pb, 2 introns	Wilkinson et Crawford, 1991
feuilles Cichorium intybus	Génomique ADNc	917 aa 5387 pb, 3 introns	Palms et al., 1996
racines Cucurbita maxima		920 aa 2754 pb	Hyde et al., 1991
cotylédons <i>Glycine max</i>	ADNc	918 aa NR1: 2661 pb, 886 aa	Wu et al., 1995
feuilles Hordeum vulgare	ADNc	NR2: 2673 pb, 891 aa 7300 pb, un intron de	Schnorr et al., 1991
feuilles Licopersicom esculentum	Génomique	2700 pb 5309 pb, 911 aa	Daniel-Vedèle et al., 1989
feuilles Lotus japonica	Génomique ADNc		Waterhouse et al., 1994
Nicotiana tabaccum		6000 pb, 3 introns	Vaucheret et al., 1989
feuilles Oryza sativa	Génomique	904 aa 5400 pb, 3 introns	Choi et al., 1989
feuilles Phaseolus vulgaris	Génomique	916 aa	
racines Spinacea olacarea	Génomique	4600 pb, 3 introns 3284 pb, 2 introns	Hoff <i>et al.</i> , 1991 Prosser et Lazarus, 1990
feuilles	ADNc	926 aa	
NAD(P)H : NR			

Betula pendula		3031 bp	Friemann et al., 1991
Hordeum vulgare	ADIC	3538 bp	Miyazaki <i>et al.</i> , 1991
feuilles	Génomique	891 aa	

Tableau 1:Tableau récapitulatif des différents gènes nia isolés selon l'espèce et le type<br/>d'organe. Les principales caractéristiques de ces gènes sont reportées: taille<br/>de la séquence nucléotidique, nombre d'introns et taille de la protéine en<br/>acides aminés.

ont remplacé chacun des cinq résidus cystéine du domaine cytochrome réductase d'une NR de feuille de maïs par d'autres acides aminés par mutagenèse dirigée et ont conclu que la cystéine est essentielle au transfert efficace des électrons des nucléotides pyrimidiques aux flaviniques.

#### III. Structure primaire de la nitrate réductase

Les méthodes utilisées pour l'isolement du gène codant pour la nitrate réductase sont souvent basées sur l'isolement de messagers polyadénylés de plantes mises en conditions d'induction de l'enzyme. Après transcription inverse des ARNm, des banques d'ADNc ont été construites dans des phages  $\lambda$ .

Le premier ADNc de nitrate réductase a été isolé chez l'orge (Cheng *et al.*, 1986), cependant sa taille n'était que de 1,1 kb. Le premier ADNc complet a été isolé chez la courgette (Crawford *et al.*, 1986). Le tableau 1 récapitule quelques gènes *nia* de végétaux supérieurs isolés ainsi que les caractéristiques des séquences nucléotidiques et protéiques.

Chez les plantes supérieures, le nombre de gènes varie de une copie chez les *Solanaceae* (Pelsy et Caboche, 1992) à huit copies, selon le cultivar, chez le riz (Kleinhofs *et al.*, 1988). On ne connaît pas la raison pour laquelle certaines plantes possèdent plusieurs gènes codant pour une nitrate réductase (sauf pour les plantes diploïdes qui ont le nombre de copies de gène égale au nombre de génome haploïde); d'après Hoff *et al.* (1992), cela peut être lié à une optimisation de la réduction du nitrate dans différentes conditions physiologiques.

La position des introns est généralement bien conservée (figure 7). Chez les plantes supérieures, seule la région molybdique en contient. Ces introns ne séparent pas les unités fonctionnelles et leurs tailles varient d'une espèce à l'autre (Daniel-Vedèle *et al.*, 1989). La conservation de l'emplacement ne signifie toutefois pas conservation du nombre d'introns. En effet, alors que la plupart des gènes codant pour des nitrate réductases de plantes supérieures en contiennent trois, le gène *nia2* d'*Arabidopsis thaliana* en contient deux (Wilkinson et Crawford, 1991 et 1993) et le haricot en contient quatre dans le gène *nia2* (Jensen *et al.*, 1994).

Chez les champignons ou les algues, il n'y a pas conservation de l'emplacement des introns. Ceux-ci sont localisés plus aléatoirement dans le gène *nia*. Une même variabilité est observée quand au nombre d'introns par gène; par exemple chez *Volvox carteri* il y en



*Figure 7:* Structure des gènes nia de quelques plantes supérieures (d'après Caboche et Rouzé, 1990). Pour chaque gène, les tailles de la séquence 5' non traduite de l'ARNm, des exons et des introns sont données en nombre de nucléotides.

a 10 par gène (Gruber *et al.*, 1992), quatre chez *Letosphaera maculans* dont un dans la région hémique (Williams *et al.*, 1994) et chez *Neurospora crassa* un seul dans la région hémique (Okamoto *et al.*, 1991).

Cependant l'analyse des séquences codantes des gènes *nia* indique que la structure des protéines nitrate réductase est conservée et un seul modèle a été proposé pour décrire toutes les nitrate réductases eucaryotiques (Figure 2 selon Caboche et Rouzé, 1990).

Les séquences primaires des domaines catalytiques des nitrate réductases ont été comparées à celles des protéines à pouvoir oxydo-réducteur (pour revue: Caboche et Rouzé, 1990): la partie flavinique présente une homologie avec la cytochrome b5 réductase (Yubiushi *et al.*, 1987) et la partie hémique avec le cytochrome b5 (Le et Lederer, 1983 ; Calza et *al.*, 1987). En ce qui concerne la partie molybdique, très peu d'homologies sont retrouvées avec les autres molybdoprotéines sauf pour les 80 premiers acides aminés qui présentent des régions d'homologie avec la sulfite oxydase (Crawford *et al.*, 1988)(Figure 8).



*Figure 8: Représentation schématique des régions d'homologies de la protéine nitrate réductase avec d'autres protéines oxydo-réductrices et des régions sensibles à la protéolyse par la trypsine (a) et la protéase V8 (b). Les chiffres indiquent les pourcentages d'homologies entre la nitrate réductase et les différentes protéines oxydo-réductrices indiquées.* 

### IV. Régulation de l'assimilation du nitrate

Contrairement au métabolisme carboné, les régulations s'exerçant sur l'assimilation du nitrate sont encore mal connues.

Les végétaux supérieurs peuvent assimiler le nitrate soit dans les feuilles, comme les herbacées, soit dans les racines comme les ligneux ou les plantes à croissance lente (Gojon *et al.*, 1994). Lors de la germination de la graine, cette assimilation se fait toujours dans les jeunes racines.

Les études menées ces dernières années sur les mécanismes de régulation de la réduction du nitrate ont abouti à deux conceptions. Selon certains auteurs c'est la disponibilité en énergie et en squelettes carbonés qui régule la nitrate réductase (Pace *et al.*, 1990; Glaab et Kaiser, 1993). Pour d'autres, le flux de nitrate constitue le facteur primordial de la régulation de la réduction du nitrate (Ismande et Tourraine, 1994; Gojon *et al.*, 1994).

#### IV. 1. Absorption du nitrate et activité nitrate réductase

L'absorption du nitrate est un processus qui demande de l'énergie puisque, pour un équivalent nitrate absorbé, la plante dépense une mole d'ATP (Glass, 1988).

L'absorption semble se faire selon deux mécanismes présentant des cinétiques Michaelienne différentes. Il existe un système de transport actif, sensible aux inhibiteurs métaboliques, inductible par le nitrate mais présentant une faible affinité pour ce dernier (Glass, 1988). Le second système, moins sensible aux inhibiteurs métaboliques, est un système de transport passif (Hedrich et Schroeder, 1989; Siddiqi *et al.*, 1990).

De nombreux gènes codant pour des transporteurs de nitrate ont été isolés chez les végétaux supérieurs (pour revue: Daniel-Vedèle *et al.*, 1998). Les travaux effectués sur les transporteurs de nitrate chez de levures et de champignons ont largement contribué aux avancées concernant la connaissance des transporteurs chez les plantes supérieures. Ainsi, par homologie avec les transporteurs *crnA* chez *Aspergillus nidullans* (Unkles *et al.*, 1991) et *nar*-3 et *nar*-4 chez *Clamydomonas reinhardtii* (Quesada *et al.*, 1994) il a été suggéré que les ADNc pBCH1 et pBCH2 isolés chez l'orge par RT-PCR (Trueman *et al.*, 1996) étaient des transporteurs de nitrate. Une même approche de RT-PCR a été utilisée pour isoler un ADNc d'un gène codant pour un transporteur de nitrate chez *Nicotiana plumbaginifolia* (Quesada *et al.*, 1997).

Le gène *Chl1* a été cloné chez *Arabidopsis thaliana*. Ce gène coderait pour un transporteur à faible affinité chez le nitrate. L'expression de ce gène dans des oocytes de *Xenopus* induit la production d'une protéine CHL1 en présence de nitrate et par des pH faibles. Elle permet le transport du nitrate et du chlorate (analogue du nitrate) (Tsay *et al.*, 1993). Plus récemment, deux transporteurs de nitrate ont été isolés chez *Arabidopsis thaliana* en utilisant la technique de differential display ou de RT-PCR à l'aide d'amorces dégénérées (Filleur et Daniel-Vedèle, 1999; Zhuo *et al.*, 1999). Ces deux gènes, *Nrt1;1At* et *Nrt2;1At*, présentent des homologies de 86% au niveau des acides aminés et 89% au niveau des acides nucléiques avec les autres transporteurs eucaryotiques à forte affinité.

Tous les gènes codant pour un transporteur de nitrate, codent pour une protéine d'environ 55 kDa chez les levures et les champignons et pour une protéine de 65 kDa chez les plantes supérieures. Elles comportent toutes 12 domaines trans-membranaires. Cette structure avec 12 domaines trans-membranaires est retrouvée chez tous les transporteurs (acides aminés, sucres ou ions) des végétaux supérieurs (pour revue: Logan *et al.*, 1997).

L'absorption de l'ion nitrate est couplée soit à un symport des protons dans la cellule végétale (McClure *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1992), soit à un antiport d'un ion HCO3<sup>-</sup> (Tourraine *et al.*, 1988). Elle entraîne une alcalinisation du milieu (Dijkshoorn, 1962) et la mise en œuvre d'une régulation du pH intracellulaire (Raven et Smith, 1976). La présence d'ions ammonium dans le milieu réduit le problème d'alcalinisation cytosolique, car l'absorption d'un ion NH4<sup>+</sup> est couplée à l'antiport d'un proton. Les plantes réduisant le nitrate dans les feuilles produisent des acides carboxyliques et des acides aminés qui constitueraient des signaux capables de contrôler l'absorption du nitrate par le système  $NO_3^-/HCO_3^-$ . Ainsi l'addition de glutamine, voir d'arginine, inhibe l'absorption de  $NO_3^-$  (Tourraine *et al.*, 1994). La capacité d'absorber le nitrate contrôlerait

alors la distribution de l'activité nitrate réductase dans les feuilles et les racines (Ismande et Tourraine, 1994). Selon une étude de Gojon *et al.* (1994), c'est la disponibilité du nitrate qui contrôlerait la taille des pools racinaires du nitrate qui, soit s'accumule dans les vacuoles, soit entre dans le processus de réduction, soit est transporté dans la stèle vers les feuilles. La distribution de l'ANR au sein d'une plante serait déterminée par la distribution du nitrate et les besoins locaux en azote réduit.

L'ion nitrate absorbé du sol n'est pas uniformément distribué dans les cellules d'un tissu particulier. Chez des racines de maïs, lors d'un apport de 200 µM de nitrate dans le milieu, l'accumulation du nitrate et la présence de la protéine nitrate réductase ne sont détectées que dans les cellules de l'épiderme. A plus forte concentration (20 mM), la protéine NR est aussi retrouvée dans les cellules corticales (Rufty *et al.*, 1986). Par immunolocalisation sur des coupes de racines de maïs, Federova *et al.* (1994) ont observé la présence de NR dans les cellules de l'épiderme, du cortex, mais également dans le péricycle et le parenchyme vasculaire.

Dans les racines de chicorée, selon la concentration en nitrate fournie par la solution nutritive, une accumulation importante d'ARN est observée soit dans le cortex, soit dans la stèle pour des concentrations respectives de 0,2 à 5 mM (Palms *et al.*, 1996).

Tous ces résultats semblent indiquer que la distribution du nitrate est un paramètre déterminant de l'expression tissulaire du gène la NR.

#### IV. 2. Activité NR, métabolisme carboné et pouvoir réducteur

La réduction du nitrate en ammonium, puis l'incorporation de celui-ci en acides aminés consomment du pouvoir réducteur, des squelettes carbonés et de l'ATP. Il n'est donc pas surprenant que les réactions de réduction du nitrate se déroulent principalement dans les cellules du mésophylle, là où a lieu la photosynthèse. En effet, on considère que 55 % du carbone assimilé peut être consommé par le métabolisme azoté (Huppe et Turpin, 1994).

Les feuilles reçoivent le nitrate provenant de l'absorption racinaire et distribuent les acides aminés glutamine et asparagine, issus de leur activité d'assimilation, à l'ensemble de la plante (Cooper *et al.*, 1986).

Comme la nitrate réductase est une enzyme cytosolique et que la source de pouvoir réducteur est produite dans le chloroplaste, il doit exister un système de transfert du NADH du chloroplaste vers le cytosol. Un tel système a déjà été suggéré par Klepper *et al.* (1971) dans lequel le dihydroxy-acétone-phosphate (DHAP), produit par le chloroplaste, est transporté dans le cytosol et converti en 3-phosphoglycéraldéhyde (PGA). Cette conversion permet la production de NADH et d'ATP. Le PGA est alors transporté vers le chloroplaste, et le NADH du cytosol peut être utilisé pour la réduction du nitrate (figure 9 a). Un autre système a été proposé par House et Anderson (1980), basé sur une navette

malate/oxaloacétate (OAA). La synthèse du malate dans la mitochondrie nécessite du NADPH, et, après son transport dans le cytosol, il est oxydé en oxaloacétate. Le NADH alors produit est utilisé par la nitrate réductase (figure 9 b).

En plus de l'ATP et du pouvoir réducteur, l'assimilation du nitrate exige des squelettes carbonés. En effet, l'accumulation d'ammonium étant toxique, la plante est obligée de l'incorporer dans la fraction organique sous forme de glutamine. Cette dernière peut être soit une forme de stockage d'azote, soit une forme de transport, soit le point de départ du métabolisme de l'azote organique.

Les métabolites carbonés et azotés circulent dans la plante, et leur distribution est soumise à la compétition qui s'exerce entre les différents tissus non producteurs (appelés puits). Ces tissus sont de jeunes feuilles, le système racinaire et encore des fruits en voie de développement. Ces rapports de force entre ces différents tissus changeant au fur et à mesure que la plante se développe, le transport des métabolites azotés et carbonés est aussi soumis à ces changements.

Il est donc important d'étudier les interactions entre ces deux métabolismes afin de mieux comprendre leur régulation. Les premières études démontrant ces relations ont été réalisées sur des algues unicellulaires (Syrett, 1953, 1956 et 1988). Il existe, d'une part, une compétition entre les deux voies pour les électrons produits par la photosynthèse. Et d'autre part, la réduction du nitrate dépend de la quantité de pouvoir réducteur et d'énergie produite par la fixation du gaz carbonique. Les enzymes de la voie de réduction du nitrate sont stimulées par le pouvoir réducteur provenant de la photosynthèse pour les tissus foliaires ou par le métabolisme des sucres pour les tissus racinaires.

Les relations entre l'assimilation du carbone par la photosynthèse et l'assimilation azotée dans les feuilles ont fait l'objet de nombreuses recherches (Bloom *et al.*, 1989; De La Torre *et al.*, 1991; Vincentz *et al.*, 1993; Foyer *et al.*, 1994). Il existe une synchronisation de l'assimilation azotée et de la fixation du carbone ainsi que sa répartition au sein de la plante (Huber *et al.*, 1992a; Manh *et al.*, 1993).

Etude Bibliographique



Figure 9: Représentation schématique des navettes produisant du NADH dans le cytosol.

### V. Régulation de la nitrate réductase

#### V.1. Le nitrate

Le nitrate est le substrat de la nitrate réductase, mais aussi un inducteur spécifique de la production de cette enzyme. Cette dernière propriété a été démontrée dans la plupart des études réalisées depuis Tang et Wu en 1957 (pour revue: Srivastava, 1980). A de rares exceptions près (Streit *et al.*, 1985), les gènes de NR des bactéries, champignons et des plantes supérieures répondent à l'induction par le nitrate (Kleinhofs et Warner, 1990 pour revue). Des concentrations variables de nitrate sont cependant nécessaires pour une induction optimale de la NR selon les différentes espèces, ce qui est probablement lié au taux d'incorporation *et/ou* de mobilisation différents suivant les génotypes (Srivastava, 1980). Quand une plante entière ou des organes excisés sont incubés dans un milieu contenant du nitrate, après un temps de latence de 15 à 45 minutes l'ANR augmente linéairement pendant 180 à 400 minutes. Par la suite, un niveau moyen est maintenu. Cependant, si on ôte le nitrate du milieu, l'activité nitrate réductase décline. L'augmentation linéaire d'activité NR est réduite par des inhibiteurs de la transcription et de la traduction. Chez un grand nombre d'espèces, l'apport de nitrate stimule la synthèse

d'ARNm NR. Par exemple, chez *Cucurbita maxima* (courge) une augmentation de la synthèse d'apoprotéine en réponse au nitrate est liée à une augmentation des quantités d'ARNm NR (Crawford *et al.*, 1986). Vincentz et Caboche (1991) ont montré, par l'analyse de plantes transgéniques, que l'induction de la NR par le nitrate était due à un mécanisme transcriptionnel de régulation. Cette hausse de la transcription nécessite des plastes intacts dans les cotylédons (Oelmuller et Briggs, 1990). Chez l'orge, quand des germinations, poussé sur un milieu dépourvu de nitrate, sont transférées sur un milieu en contenant, les ARNm NR passent d'un taux très faible à un taux élevé en quelques heures à la fois dans les racines ou les bourgeons (Melzer *et al.*, 1989). Dans des plantules de tabac ou de tomate cultivées sur nitrate, de nouvelles applications de nitrate augmentent le taux d'ARNm NR (Galangau *et al.*, 1988). Dans des racines de maïs, l'augmentation d'ANR en réponse au nitrate est corrélée au taux d'ARNm NR (Long *et al.*, 1992; Li et Oaks, 1995). Dans des racines de chicorée, le taux d'ARNm augmente après un quart d'heure d'induction par 5mM de nitrate, pour être stable au bout de quatre heures. Cette induction n'est pas observée dans les feuilles (Palms *et al.*, 1996).

L'effet du nitrate sur des enzymes NAD(P)H:NR a également été examiné. Chez l'orge, par exemple, des gènes codant à la fois pour une NADH:NR et une NAD(P)H:NR ont été isolés et séquencés (Schnorr *et al.*, 1991; Miyazaki *et al.*, 1991). Ils montrent un grand degré de similitude, mais divergent pour la partie 5'. Cette divergence indique aussi qu'il pourrait exister une différence de régulation dans l'expression de ces deux gènes. Chez le soja, l'apport de nitrate n'a pas d'effet sur l'activité NR de la forme NAD(P)H:NR mais seulement sur celle de la forme NADH:NR (Streit *et al.*, 1985, 1987). Toutefois, chez l'orge, les ARNm NADH:NR et NAD(P)H:NR ont des niveaux détectables dans les feuilles et les racines 15 à 30 minutes après que les racines des plantules ont été mises en contact avec le nitrate (Sueyoshi *et al.*, 1995). La privation en nitrate déclenche une chute rapide à la fois dans des quantités d'ARNm et de l'ANR des deux iso-formes de la nitrate réductase. Cela indique que, chez l'orge, les deux gènes *Nar*1 et *Nar*7, codant respectivement pour NADH:NR et NAD(P)H:NR, sont sous le contrôle d'une même régulation par le nitrate.

Toutes ces études montrent que les gènes de nitrate réductase des végétaux supérieurs sont inductibles par le nitrate. Cependant, il existe des exemples de gènes *nia* qui sont exprimés de façon constitutive. Chez *Clematis vitalba*, Bungard *et al.* (1999) montrent que l'ammonium peut activer les nitrate et nitrite réductases en absence de nitrate. L'activité

NR peut augmenter jusqu'à 3 fois en absence de  $NO_3^{-}$ . Des analyses par Western blot montrent que l'ammonium induit la synthèse de protéine NR et NiR, mais pas de la glutamine synthase. Il est de plus montré que des plantes de tabac et de bouleau placées dans les mêmes conditions ne montrent pas une telle réponse à l'ammonium. C'est la première publication montrant une telle réponse à l'ammonium. En effet, d'autres publications ont montré que l'ammonium pouvait stimuler l'ANR mais en synergie avec le nitrate, jamais en son absence (Rajasekhar et Mohr, 1986; Takacs et Técsi, 1992). Chez le colza, il a été récemment montré au laboratoire que l'ammonium avait aussi un effet inducteur sur la nitrate réductase (Leleu *et al.*, 2000).

#### V.2. La glutamine

On a pu remarquer chez de nombreuses espèces végétales l'inhibition de l'ANR par un ajout de glutamine. Cette inhibition intervient au niveau transcriptionnel comme chez le soja (Callaci et Smarelli, 1991; Wu et al., 1995), le tabac (Deng et al., 1991; Vincentz et al., 1993), le maïs (Li et Oaks, 1993) ou encore chez des cultures cellulaires d'épinard (Shiraishi et al., 1992). L'inhibition causée par la glutamine peut être partiellement levée par une addition de glucose dans des feuilles de tabac (Vincentz et al., 1993). Le niveau endogène de glutamine semble aussi contrôler l'expression de la nitrate réductase. En effet, chez le tabac, l'inactivation de la glutamine synthétase, qui aboutit à une chute dans la concentration de glutamine endogène, provoque une hausse du taux d'ARNm NR (Deng et al., 1991). Dans des plantules de maïs, la nitrate réductase des racines est plus sensible aux apports de glutamine que celle des feuilles. Ceci est apparemment du au fait que la NAD(P)H:NR (enzyme principalement racinaire) est plus sensible que la NADH:NR (Long et al., 1992). Cependant, les taux d'ARNm des racines et des feuilles sont sensibles de la même manière aux fluctuations de la glutamine. Ainsi, il doit exister un régulateur post-tanscriptionnel supplémentaire dans les racines en présence de glutamine.

Dans des cultures cellulaires d'épinard, il a récemment été montré que les gènes de NR et de NiR ne seraient pas co-régulées par la glutamine alors qu'ils le sont par le nitrate (Ogawa *et al.*, 1999).

#### V.3. Les cytokinines et l'acide abscissique

Des ajouts exogènes de cytokinines influencent positivement l'ANR, cependant, l'amplitude de la réponse dépend de l'espèce étudiée, de la concentration et la nature de la cytokinine utilisée. De plus, il semblerait que le taux de cytokinines endogènes soit un facteur important dans la sensibilité aux cytokinines exogènes. En effet, il est à noter que les tissus qui ne répondent pas aux cytokinines sont déjà riches en cytokinines (Banowetz, 1992). Comme pour le nitrate, les cytokinines semblent agir au niveau transcriptionnel sur l'induction de l'ANR (Lu et al., 1992; Samuelsson et al., 1995). Cependant, il faut noter que Lu et al. (1992) réalisent l'induction par le nitrate et la lumière puis par les cytokinines. L'induction par les cytokinines est plus forte en présence de nitrate qu'en son absence (Banowetz, 1992), bien que ces deux inducteurs ne semblent pas agir en synergie (Samuelsson et al., 1995). Samuelsson et al. (1995) ont également montré que l'apport de nitrate augmentait le niveau de zéatine riboside dans les racines et les pousses de l'orge. Ceci pourrait déterminer l'influence d'apport exogène de cytokinines sur l'ANR en présence de nitrate. Le mécanisme exact de l'induction de la transcription par les cytokinines n'est pas encore connu. Cependant, Suty et al. (1993) ont montré que les ARNm transcrits en présence de cytokinines ont une polyadénylation différente qui pourrait affecteur leur durée de vie.

Yu *et al* (1998) ont montré qu'il existe une différence d'expression des gènes *nia*1 et *nia*2 d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à un traitement par la benzyl-adénine. L'ANR est inductible par un traitement avec cette hormone. Cependant, le gène *nia*2, responsable de 90% de l'ANR (Wilkinson et Crawford, 1991), n'est pas activé alors que le gène *nia*1 voit son niveau de transcription augmenter fortement.

L'acide abscissique réprime l'expression du gène NR chez l'orge. Cependant, cette répression peut être contrebalancée par une concentration égale de benzyladénine (Lu *et al.*, 1992). Ainsi, l'acide abscissique semble agir, comme les cytokinines, au niveau transcriptionnel. Par contre, les travaux réalisés sur la chicorée ont montré, contrairement au modèle général, une augmentation de l'ANR dans les racines en présence d'ABA (Chraibi, 1988). L'accroissement d'activité NR en présence d'acide abscissique a été confirmée dans des plantules de chicorée âgées de trois semaines. Cependant, une surexpression du gène nia, ainsi qu'une augmentation du taux de protéine NR, sont

observables, impliquant une régulation transcriptionnelle (Goupil et al., 1998).

Bueno *et al.* (1994) suggèrent quant à eux, que l'augmentation d'ANR due à la kinétine dans des cotylédons de *Cicer areitenim*, est due à la fois à la synthèse et à la déphosphorylation de l'enzyme.

#### V.4. Les auxines

Les résultats sont très contradictoires, ainsi, il est impossible de dégager un schéma d'action généralisable. Par exemple, l'apport exogène d'auxine entraîne une répression de l'ANR chez le maïs (Rao *et al.*, 1984), une activation chez le blé (Klepper, 1979) et une activation enzymatique et transcriptionnelle de la NR chez la chicorée. Cependant, dans le dernier cas, il semblerait que cela soit dû à un effet indirect lié à la rhizogenèse (Vuylsteker *et al.*, 1997).

#### V.5. La lumière

#### V.5.1. Nature du signal

La lumière augmente l'activité nitrate réductase (ANR) chez la plus grande partie des plantes supérieures, cette augmentation d'ANR dépend de la transcription des gènes NR (Melzer *et al.*, 1989; Mohr *et al.*, 1992). Dans les feuilles étiolées, le signal est perçu par le système du phytochrome qui, cependant, semble jouer un rôle mineur dans la réponse de la NR à la lumière dans les feuilles vertes (Thompson et White, 1991).

Dans les feuilles vertes de *Perilla*, Kannangara et Woolhouse (1967) ont montré que l'induction de la NR est possible seulement en présence de  $CO_2$ . La fixation du  $CO_2$  par la photosynthèse est souvent nécessaire pour une ANR maximale (Klepper *et al.*, 1971; Kaiser et Brendel-Behnisch, 1991). Ceci laisse suggérer une action indirecte de la lumière sur la transcription de la NR via les photoassimilats.

#### V.5.2. Régulation du taux d'ARNm et synthèse de novo de l'enzyme.

Les taux d'ARNm et de protéine NR ainsi que l'ANR suivent un rythme circadien pour ce qui est de l'effet lumière (Lillo, 1984; Lillo et Ruoff, 1989). La lumière régule le taux d'ARNm, par contre il existe également un rétrocontrôle sur ce taux d'ARNm NR. On pense que certains métabolites issus de l'assimilation du nitrate

atteignant une certaine concentration dans la cellule, entraînant une baisse de la synthèse d'ARNm NR. En effet, des mutants de *Nicotiana plumbaginifolia* défectueux dans le cofacteur molybdique ne présentent pas d'ANR (Pouteau *et al.*, 1989). L'assimilation du nitrate n'est pas possible dans de tels mutants et les fluctuations circadiennes de quantités d'ARNm NR sont abolies. L'existence d'un rétrocontrôle négatif par des métabolites issus de l'assimilation du nitrate a été démontrée par des expériences au cours desquelles on fournit du tungstène à des feuilles de tabac, donnant de ce fait une enzyme NR non fonctionnelle. Dans ces feuilles, la production d'ARNm NR est toujours constante (Deng *et al.*, 1989).

La glutamine semble être le composé qui exerce un contrôle négatif sur l'expression de la NR (Callaci et Smarrelli, 1991; Deng *et al.*, 1991; Shiraishi *et al.*, 1992).

L'induction positive par la lumière et le feed-back négatif causé par la glutamine empêchent une surexpression des gènes NR.

Généralement, chez les végétaux supérieurs, l'ANR, le taux de protéine et le taux d'ARNm NR sont élevés au début de la photopériode et diminuent 5 à 6 heures plus tard même quand les plantes sont exposées à de fortes intensités lumineuses (Lillo, 1984; Galangau *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1989; Lillo et Ruoff, 1989). Une augmentation de la quantité d'ARNm NR ou de l'ANR est aussi observée pendant la nuit (Lillo, 1984; Galangau *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1989). La dégradation de l'amidon et sa remobilisation dans les chloroplastes pendant une période d'obscurité (Gordon *et al.*, 1980) peut causer ces augmentations.

L'influence des changements de température ou des conditions d'éclairement dans les pièces de cultures peuvent parfois compliquer l'interprétation des effets de la lumière. Des plants de blé ont été soumis à des températures constantes le jour comme la nuit, des échantillons sont prélevées toutes les heures ou demi-heures et permettent d'observer une subite augmentation des ARNm NR. Le taux d'ARNm atteint son maximum à peu près une heure après que la lumière soit allumée puis chute, bien que les plantes soient toujours maintenues à la lumière (Lillo, 1991). Des expériences de run-off montrent que l'augmentation d'ARNm est due à une augmentation d'activité transcriptionnelle (Lillo, 1991).

L'induction par la lumière nécessite des intermédiaires qui proviennent des produits de la fixation du  $CO_2$ : le saccharose ou le glucose peuvent remplacer l'induction d'ARNm NR par la lumière des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Les éléments qui contrôlent cette

réponse au saccharose et au glucose sont localisés dans une région de 2,7 kb en amont du gène NR, comme l'ont démontré Cheng *et al.* (1992) par l'utilisation de gènes rapporteurs.

#### V.5.3. Modulation de l'ANR par la lumière au niveau protéique

- <u>pH</u>. Buchanan (1980) a montré que le pH du stroma, augmentant en présence de lumière, peut contribuer à une augmentation d'activité de nombreuses enzymes. Il a également été démontré que le pH du cytosol augmente de 0,2 à 0,5 unités en réponse à la transition obscurité / lumière (Kurkdjan et Guern, 1989). Bien que le pH ait été jugé comme influençant très peu l'ANR (Kaiser et Brendle-Behnisch, 1991), des publications plus récentes montrent que le pH optimum pour l'activité de la NR est plus élevé en tampon phosphate de potassium (7,8) qu'en tampon HEPES (7,5), à la fois chez la courge et l'orge (Lillo, 1994a). D'après Lillo (1994a) le tampon phosphate de potassium reflète mieux le pH physiologique optimum et une augmentation de 0,5 unités pH résulte en une augmentation de 100% d'ANR.

#### - Influence de l'adénine et des nucléotides pyrimidiques. A certaines

concentrations, le NADH est généralement considéré comme inhibiteur de l'ANR. Cependant, Aryan et Wallace (1985) ont montré que l'inhibition de l'ANR par le NADH agit par l'intermédiaire de radicaux superoxyde produits dans les extraits. A part cela, l'inhibition par le NADH a été trouvé avec des combinaisons avec du cyanure ou de l'hydroxylamide, qui bloquent la sous-unité molybdique (Solomonson et Barber, 1990). Lillo et Ruoff (1992) ont montré que le NAD(P)H active la NR, et que l'interconversion entre une forme de faible activité et une autre avec une activité spécifique doublée dépend de la présence de NAD(P)H.

Les nucléotides dérivés de l'adénine influencent l'ANR selon plusieurs voies complexes. L'ADP inhibe l'ANR d'environ 50% (Sanchez et Heldt, 1990). L'ATP inhibe également l'ANR chez l'épinard (Kaiser et Spill, 1991) ou chez des espèces comme la courge, l'orge ou l'avoine (Lillo, 1994b). On pense que cette inactivation par l'ATP est due à la phosphorylation de l'enzyme.

- <u>Inhibition par le calcium et le magnésium</u>. L'ANR dans les extraits foliaires bruts d'épinard ou de courge provenant de plantes transférées à l'obscurité pour quelques heures ou même quelques minutes est inhibée par 5mM de Mg<sup>2+</sup> et de Ca<sup>2+</sup>.

Ceci est contraire à ce qui est observé avec des extraits faits quelques heures après le début de la photopériode, qui ne montrent pas ou très peu d'inhibition de l'ANR par le Mg<sup>2+</sup> et de Ca<sup>2+</sup> (Huber *et al.*, 1992b; Kaiser *et al.*, 1992; Riens et Heldt, 1992; Lillo, 1994b). De tels résultats suggèrent l'existence de deux différentes formes de la NR à la lumière et à l'obscurité. La comparaison de la forme purifiée de la NR et les formes dans des extraits de plantes à la lumière ou à l'obscurité montre que la forme trouvée à l'obscurité correspond à la forme de la NR montrant un phénomène d'hysteresis, et que la forme à la lumière correspond à celle montrant une formation continue de produits (Lillo, 1994c).

Le calcium est depuis longtemps considéré comme un messager secondaire important dans les cellules animales et plus récemment chez les plantes (Roberts et Harmon, 1992). Cependant, la NR n'est pas aussi sensible aux changements de calcium qu'elle ne l'est à la calmoduline (Roberts et Harmon, 1992). D'après Lillo (1993), la NR est sensible à des concentrations de calcium d'environ 100  $\mu$ M. Le calcium peut être remplacé par le magnésium. Si la concentration en magnésium est plus importante dans le cytoplasme des cellules que celle du calcium, le magnésium est alors un inhibiteur plus puissant que le calcium.

#### V.5.4. Modélisation de l'influence lumière/obscurité sur la NR

Après la réduction du nitrate en nitrite dans le cytosol par la NR, le nitrite est converti en ammonium par la nitrite réductase dans les chloroplastes. Cette réduction est dépendante de la lumière. En effet, la ferrédoxine réduite par la photosynthèse est le donneur d'électron. Cependant, on peut se demander s'il n'existe pas un risque d'accumulation de nitrite dans la cellule à l'obscurité. Sanchez et Heldt (1990) n'ont pas observé d'accumulation de nitrite et ont montré que l'ANR chute de 15% avec une demi-vie de seulement deux minutes quand des feuilles d'épinard sont mises à l'obscurité. Plusieurs facteurs, tels que la baisse de pH, une augmentation de la concentration en ADP ou en phosphate (Sanchez et Heldt, 1990), et probablement le cyanure ou des superoxydes (Solomonsen et Barber, 1990) peuvent contribuer à réduire l'ANR à l'obscurité et ainsi éviter l'augmentation de nitrites. Cependant, il a été montré par Sanchez et Heldt (1990) que ces facteurs ne sont pas suffisants pour inactiver la nitrate réductase.

Quand le milieu est épuisée en NAD(P)H *in vitro*, la NR est convertie en une forme moins active montrant un comportement d'hysteresis pendant environ trente minutes (Lillo
et Ruoff, 1992). Ceci est trop lent pour expliquer la demi-vie de deux minutes entrevue pour la désactivation de la NR. Cependant, l'enzyme est immédiatement et très fortement inhibée par le Ca<sup>2+</sup>et le Mg<sup>2+</sup> quand elle commence sa conversion en sa forme hystérétique. Une chute d'ATP et une augmentation d'ADP sont observées transitoirement dans des protoplastes d'*Avena sativa* quand la lumière est éteinte (Hampp *et al.*, 1982). Il est possible qu'une chute de la concentration du NADH puisse apparaître quand la lumière est coupée, puisque l'approvisionnement en ATP et de NADH dépend du même mécanisme navette du cycle de Calvin. Un arrêt brutal d'apport en NADH amènerait rapidement l'inactivation de la NR en présence de concentrations physiologiques de magnésium. L'ANR serait alors réactivée par un autre apport de NADH. Le comportement hystérétique de l'enzyme peut causer un retard dans la réactivation et empêcher une accumulation de nitrite. Ce retard dans la réactivation permet probablement d'avoir un temps nécessaire pour dégrader la NR et d'établir un niveau d'activité NR stable et ajusté à la capacité de réduction du nitrite à l'obscurité.

## V.5.5. Phosphorylation de la NR et inhibition par la protéine 14-3-3

Kaiser *et al.* (1991) ont découvert que l'activité nitrate réductase est régulée par un phénomène de phosphorylation/déphosphorylation de la protéine. La forme NR-phosphorylée est liée à l'inhibition de l'ANR à l'obscurité dans des feuilles et en présence d'ions divalents Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup> (Huber *et al.*, 1992a; MacKintosh, 1992). Des protéines kinases dépendantes du Ca<sup>2+</sup> et capables de phosphoryler la NR ont été caractérisées *in vitro* (Bachmann *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996; Moorhead *et al.*, 1996; Douglas *et al.*, 1998). Le site de phosphorylation qui entraîne l'inhibition de la NR a été caractérisé chez *Arabidopsis thaliana* NIA2 comme étant une Ser 534 et chez l'épinard une Ser 543; cette Ser se trouve dans la charnière 1 de toutes les NR de plantes supérieures (Douglas *et al.*, 1995; Bachmann *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1996). Par mutagenèse dirigée qui a remplacé la Ser 534 par une Asp chez *Arabidopsis thaliana* il a été possible d'obtenir une protéine NR insensible à la régulation par phosphorylation (Douglas *et al.*, 1995; Bachmann *et al.*, 1996; Moorhead *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1996). La séquence adjacente de la Ser cible est importante pour la reconnaissance par la protéine kinase et a la composition suivante:

Leu-Lys-(Lys/Arg)-(Ser/Thr)-(Val/Ile/Ala)- Ser -(Thre/Leu)-Pro-Phe-Met (Bachmann *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996).



*Figure 10: Représentation schématique de la régulation post-transcriptionnelle de la NR par mécanisme de phosphorylation / déphosphorylation.* 

La réactivation de la NR à la lumière dépend d'une protéine phosphatase de type 2A (inhibée par l'acide okadaïque et par la microcystine), qui catalyse la déphosphorylation de la NR (Huber et al., 1992b; MacKintosh, 1992; Huber et al., 1996; Moorhead et al., 1996) (figure 10). Cependant, la NR purifiée n'est pas inhibée par la phosphorylation en présence comme en absence de Mg<sup>2+</sup> (Huber *et al.*, 1996). Ceci a en plus contribué à la découverte d'un inhibiteur protéique dans les extraits bruts qui se lie à la NR. Il a été identifié comme étant une protéine d'attachement appartenant aux protéines 14-3-3 (Bachmann et al., 1996; Ferl, 1996; Sehnke et Ferl, 1996; Moorhead et al., 1996; Huber et al., 1996; Finnie et al., 1999). La structure 3D des protéines 14-3-3 animales a été déterminée, elle présente neuf hélices  $\alpha$  et forme un dimère avec deux rainures d'attachement de 30 Å (Liu *et al.*, 1995; Xiao et al., 1995). Les protéines 14-3-3 reconnaissent sur les peptides cibles une séquence Arg-Xxx-Xxx-Ser\_P-Xxx-Pro. Le phosphate est lié à deux résidus Arg et un résidu Lys dans la rainure d'attachement sur un des dimères, l'autre s'attache au résidu hydrophobe de la séquence cible (Petosa et al., 1998). Cette séquence d'attachement est similaire à celle nécessaire à la reconnaissance par la protéine kinase des NR des plantes supérieures, excepté pour l'Arg initiale qui est souvent une Lys chez la NR.

Le fait de supprimer la région N-terminale hautement acide de la NR génère un attachement de la protéine 14-3-3 moins fort qu'avec la NR native (Nussaume *et al.*, 1995; Moorhead *et al.*, 1996; Lejay *et al.*, 1997), l'existence d'un second site d'attachement pour la protéine 14-3-3 dans cette région est possible mais ne semble pas nécessiter sa phosphorylation pour effectuer l'attachement (Campbell, 1999).

Pour résumer (figure 10), la protéine NR doit être phosphorylée par le complexe Mg-ATP au niveau de la Ser cible dans la charnière 1. Cette étape est catalysée par une NR protéine kinase. En présence de Mg<sup>2+</sup>, une protéine d'attachement appartenant à la famille des protéines 14-3-3, présente dans le cytoplasme, s'attache à la NR-P et inhibe son activité. L'attachement de la protéine 14-3-3 à la NR-P semble bloquer le flux d'électron entre les domaines hèmique et Mo-ptérique par un mécanisme inconnu (Huber *et al.*, 1992b; Huber *et al.*, 1996). La protéine 14-3-3 s'attachant dans une région charnière entre les domaines hèmique et molybdoptérique, l'inhibition est sans doute due à un changement du potentiel rédox de l'hème dont la structure serait altérée (Campbell, 1999).

## V.6. Bilan des régulations

Les régulations de la nitrate réductase chez les végétaux supérieurs peuvent donc se dérouler à trois niveaux: au niveau transcriptionnel, au niveau posttranscriptionnel et au niveau post-traductionnel (pour revue: Daniel-Vedèle et Caboche, 1996). La plupart des régulations a lieu au niveau transcriptionnel. En effet, les seuls effets post-transcriptionnels ou post-traductionnels connus sont dus à l'ammonium, qui influerait négativement la stabilité des ARNm NR, et la lumière qui influence le passage de la protéine NR d'un état phosphorylé inactif à un état déphosphorylé actif. Les autres régulations ont lieu au niveau transcriptionnel. Ces régulations peuvent avoir une activité négative sur la transcription comme c'est le cas pour l'acide abscissique et la glutamine. Par contre, le nitrate, les cytokinines, les sucres et la lumière ont une effet activateur de la transcription des gènes *nia* (figure 11).



*Figure 11: Schéma récapitulatif de la régulation de la nitrate réductase chez les végétaux supérieurs.* 

Il est très surprenant de noter que l'on ne connaît que très peu le mode d'action



*Figure 12: Représentation schématique de la voie de régulation du nitrate chez les champignons filamenteux.* 

moléculaire régissant ces régulations transcriptionnelles. En effet, bien que des promoteurs de gènes de nitrate réductase aient été isolés chez les végétaux supérieurs, très peu d'études ont abouti à l'explication des mécanismes transcriptionnels.

# VI. Etudes des promoteurs de gènes de nitrate réductase

Le mécanisme de transduction du signal qui permet l'induction des gènes NADH:NR ou NAD(P)H:NR chez les plantes supérieures n'est pas connu. Il est probable que des éléments agissant en *cis* et des protéines intervenant en *trans* soient impliqués dans cette induction.

Il existe de nombreuses similitudes entre la régulation de la NR chez les plantes supérieures et chez les champignons. L'étude de la voie de régulation de la NR chez les champignons a permis de comprendre de nombreux mécanismes applicables aux plantes. En effet, il existe de nombreux mutants de régulation chez les champignons filamenteux. Chez *Neurospora crassa* (*N.c*) et chez *Aspergillus nidullans* (*A.n*) ils ont été obtenus sur la base de la résistance au chlorate (Cove, 1979; Crawford et Arst, 1993). L'analyse génétique de ces mutants a permis d'établir un modèle de régulation très similaire dans les deux espèces (figure 12).

Les gènes codant pour la NR, *Nit-3* (*N.c.*) ou *NiaD* (*A.n*), et la NiR, *Nit-6* (*N.c.*) ou *NiiA* (*A.n*), sont sous le contrôle simultané de deux régulateurs de la transcription. Le premier est le produit du gène *Nit-4* (*N.c.*) ou *NirA* (*A.n.*) qui interagit avec la NR en absence de nitrate pour former un complexe inactif. En présence de nitrate, ce complexe se dissocie et NIT-4/NIRA agit alors comme un activateur transcriptionnel des gènes de nitrate et nitrite réductases. Le clonage et le séquençage du gène NIRA (Burger *et al.*, 1991 a et b) ont montré que ce régulateur est une protéine à doigt de zinc de type C6. Chez *N. crassa* son homologue est appelé NIT-4 et le gène correspondant a été cloné par Yuan *et al.* (1991). Les autres régulateurs de la transcription sont les produits des gènes *Nit-2* (*N.c.*) ou *AreA* (*A.n.*) (Cove, 1979). La glutamine inhibe les activateurs transcriptionnels, soit directement pour AREA, soit par l'intermédiaire du gène Nmr dans le cas de NIT-2 (Sorger *et al.*, 1989). Les gènes *AreA* et *Nit-2* ont été isolés et séquencés, ils codent pour des protéines à doigt de zinc de type C2/C2 (Fu et Marzluf, 1990 a et b; Kudla *et al.*, 1990). Le doigt de zinc est une structure très conservée qui se révèle homologue à 64 % au facteur de la

lignée érythrocytaire des vertébrés GATA-1. Cette conservation entre les doigts de zinc a permis d'identifier des séquences consensus. Il existe 98 % d'identité au niveau des acides aminés entre les domaines de liaison à l'ADN des protéines NIT2 et AREA. Des expériences de retard sur gels et de « footpriting » ont montré que NIT2 reconnaît des séquences spécifiques dans la région 5' des gènes répressibles par l'azote chez *N.c* et des gènes de nitrate et nitrite réductase chez *A.n* (Fu et Marzluf, 1990 b). Une séquence consensus a été mise en évidence: TATCT (ou AGATA sur le brin complémentaire), cette séquence est retrouvée dans tous les sites de liaison. Cette même séquence consensus, (A/T)GATA(A/G) à été identifiée dans les promoteurs de gènes de globine comme site de liaison du facteur de transcription GATA-1 de lignée erythroïde (Evans et Felsenfeld, 1989). Cette protéine GATA-1 est composée de deux doigts de zinc en C4 qui constituent le de liaison à l'ADN. Ce site de liaison à l'ADN est très conservé chez les vertébrés, les invertébrés, les champignons ou les plantes (Lowry et Atchley, 2000).

Des études chez la tomate ont montré que deux régions du promoteur du gène *nia*, contenant des séquences en *cis* régulatrices (Dorbe *et al.*, 1992), étaient spécifiquement reconnues et se liaient avec la protéine NIT2 (Jarai *et al.*, 1992). Les deux régions du promoteur reconnues contenaient la séquence GATA. Ces résultats suggèrent qu'il doit exister un homologue de NIT2 chez la tomate et chez les autres plantes supérieures et que cette protéine doit jouer un rôle majeur dans l'expression de la NR. Un ADNc codant pour une protéine appartenant à la famille GATA-1 a été isolée chez le tabac (Daniel-Vedèle et Caboche, 1993). Les auteurs parlent alors d'une protéine NIT2-like (ressemblant à NIT2): NTL1. Cette protéine présente toutes les caractéristiques des facteurs de transcription: à savoir un domaine en doigt de zinc et une région basique de 39 aa dans la région en aval du doigt de zinc. Cette association doigt de zinc / région basique est retrouvée dans de nombreux facteurs de transcription et sert de domaine de liasion à l'ADN (Fu et Marzluf, 1990 c). Une région homologue d'un signal de localisation nucléaire est retrouvée également dans la séquence de NTL1. Cependant, la preuve que cette protéine NTL1 soit impliquée dans l'expression de la nitrate réductase n'a pas été faite.

Dans le but de définir des séquences en *cis* impliquées dans la régulation de l'expression des gènes NR et NiR, de nombreuses études ont été effectuées en utilisant des promoteurs couplés à des gènes rapporteurs et introduits dans des plantes. Des analyses de délétion du promoteur du gène *nii* de l'épinard fusionné au gène *UidA* dans des tabacs

Arabidopsis NR1	-143	TATTTTATTT <u>ACTCA</u> TCTCTGTAAA
Arabidopsin NR2	-255	TATTTAATTA <u>AGTCAAGTCA</u> TAAGA
	-203	AAAATTAAAA <u>AGTCA</u> CAAATGGTCC
Arabidopsis NiR	-254(r)	ATTAATTAAA <u>ACTCA</u> AAACAAAACT
	-243	AAAAAAATGA <u>AGTCA</u> ATAGACTAAG
Nicotiana nia-1	-214(r)	TTAAAAAAAT <u>AGTGA</u> CATCACAAAA
Nicotiana nia-2	-571(r)	AATTTTTAGT <u>AGTCA</u> AAAACAGTGG
	-525(r)	TAAAATGTTT <u>AGTGA</u> CATCTGAUAT
	-267(z)	TTI'AAAAAAT <u>AGTGA</u> CATCATAAAA
Maize NE	-688	CTAAAATAAT <u>ACTCA</u> CTCCGTTUCG
	-635(r)	GGGATAAAAA <u>AGTCA</u> AACGAATTAT
Maize Zunr2g	-822	TATATTT <u>TGACTAGTCA</u> GTTGCCCG
Spinach NiR	-442	TCAATTTATC <u>AGTCC</u> TTTAACATTA
	-209(r)	CATGGTTAAG <u>GGTCA</u> TTTTGTATGT
Fatunia NR	-590(r)	CATATTTTAC <u>AGTCA</u> ACGTATATCA
	-317(T)	ATTTATACAG <u>AGTCA</u> TATTGTTAAC
Rice nia	-279	GAAGAGCAAA <u>ACTCA</u> AAATTCCAAG
Tomato nia	-507(r)	CTATTTTCAG <u>AGTCA</u> AATTACAAAA
	-460	TCTATTTTAG <u>AGTCA</u> AACTATAAAA
Kidney bean NR1	-390(r)	AGAATTTTACACTCATTAAATGTTG
Kidney bean NR2	-834(r)	AAAAATITGA <u>AGTCA</u> TTAAAGTAAT
	-768(1)	TAAGTGTTTN <u>ACTCA</u> TAAAATAAGA
	-181	AAATATTTTT <u>AGTGA</u> AGAAAAAGAT
Kidney bean NiR	-585(r)	GATAATTGAG <u>ACTCA</u> TCCAAAAGGT
	-557(r)	TTTCTTTTGG <u>ACTCA</u> TGAGCGGATT
Barley MR	-274(r)	ATCG <u>AGTCAGTCAAAATCAGAAAAA</u>

Figure 13: Séquence consensus dans les promoteurs de gènes de nitrate et nitrite réductase de végétaux supérieurs d'après Hwang et al., 1997. Le noyau A(G/C)T(G/C)A est entouré par une séquence riche en A/T. Ce motif serait impliqué, d'après les auteurs, dans la réponse au nitrate.

transgéniques ont montré un élément régulateur situé dans une région de 130 pb localisée entre les nucléotides –330 et –200, avant le site d'initiation de la transcription (Rastogi *et al.*, 1993). Plus tard, la même approche a permis de localiser entre –200 et +131 des éléments nécessaires à l'expression dépendante de la lumière et du nitrate (Neininger *et al.*, 1994). Des analyses de délétion du promoteur *Nii1* du tabac ont été effectuées par des constructions avec les gène rapporteurs *UidA* et *Luc*, et introduites dans *Arabidopsis thaliana* (Dorbe *et al.*, 1998). Il est alors montré que les séquences du promoteur nécessaires à l'induction des gènes rapporteurs par le nitrate sont contenus dans les 200 premiers nucléotides du promoteur *nii*.

Cheng et al. (1992) ont montré l'induction par la lumière et le sucre du gène rapporteur CAT sous le contrôle d'une séquence de 2,7 kb de la région 5' du gène NR1 d'Arabidospsis thaliana. Dans des tabacs transgèniques contenant des gènes de nitrate réductase d'Arabidopsis, la séquence répondant au nitrate a été identifiée à l'extrémité 5': il s'agit de séquences de 238 et 188 paires de bases pour les gènes NR1 et NR2 respectivement (Lin et al., 1994). Curieusement, aucun site de liaison NIT2 n'est retrouvé dans ces séquences. Hwang et al. (1997) ont donc analysé ces séquences plus en détail afin de déterminer les régions responsables de l'induction par le nitrate. Ils ont identifié des éléments en cis nécessaires à l'induction par le nitrate par linker-scanning. Ces éléments correspondent à une séquence de 12 paires de bases qui est conservée dans les régions 5' des gènes végétaux inductibles par le nitrate: la nitrate et la nitrite réductase (Hwang et al., 1997). Les alignements de séquences de différents promoteurs de nitrate et nitrite réductase ont donc permis de mettre en évidence une région de 24 paires de bases constituée d'un motif riche en A/T encadrant le noyau A(C/G)TCA (figure 13). Pour mettre en évidence les séquences impliquées dans la régulation transcriptionnelle de la NR chez le haricot, Jensen et al. (1996) ont introduit dans du tabac des constructions promoteur NR: UidA où le promoteur avait subit diverses délétions. Ils n'ont cependant pas réussi à mettre en évidence une régulation significative par le nitrate. Plusieurs hypothèses sont avancées à cela: celle, par exemple, que l'enzyme GUS serait si stable qu'elle persisterait sur le milieu ammonium, donc que l'effet du nitrate serait masqué par le fort niveau d'expression du gène UidA. Une autre explication serait que GUS soit exprimée constitutivement et que les éléments d'induction par le nitrate ne soient pas présents dans les constructions réalisées. Cette dernière explication rejoint celle avancée par Vaucheret et al. (1992) qui ont montré qu'un fragment de 1,35 kb du promoteur NR (nia1) fusionné à

tabac1	TCTTTGAGTAATGTATACATTTAAGAGCTATATATATATATATATATATAGACCCTGCAATGAAAGAGGAAGCTAACCTGTTTGCCTTTGTCGTATTCTGCAA
tabac2	TACATACAAGGGCGCGCAATAAACTTTTTTAAAGTAAATGTATATGAACTTGCAATGAAAGAGGACCTTAACTTGTTTGTCTTTGTTGCTTTCTGCAA
tomate	TACGATGAAA-AA
A.thaliana	
Phaseolus	ATTTTCAT
Petunia	TTTGCTTATATATATATCGGTTCGGTTCGGTTCG
L.japonica	GAAGAAGAA
tabac1	ATTTCAGTTTAAAAGCCCATTTGAGATTGAATTAATTCGTTATAACCAACGATATCAAAGAAAACAATTAGTTAAATGCTTGTGTAATT
tabac2	ATTTCACCTTAACAGCCCATTTGAGATTGATTAGTTAGTT
tomate	TACACCTTAAAATGTGATTTACTCGAA-GTTTTTGTA
A.thaliana	A
Phaseolus	GGTTGAACGAAAAAGGATTATAT
Petunia	ATCAGTACTGCTAAAAAATAACCTAATAACTGGTTCGGTTCGGTTCGGTTAATTCGATTTTTCGAAAAATCATCGACACCCCTAGTGGAA-GTTTTTGTATGCAAGGCACGCAGATTCAAGTC
L.japonica	TTCACCCAAATTTGATATTTATTAGTGTGTGT
	* *
tabac1	TGAAGAATTTTTTTTGGACGTGGTCGCTGAAAACAGTTGGAGAAATACTTTCTGAAAAGTTGG
tabac2	TGAAGAAAATATTTGGACGTGCTCGCTGAAAACATTATACTCCTATATAATAGAAATACTTTCTGAAAAGTTGG
tomate	TGA
A.thaliana	
Phaseolus	ATATAA
Petunia	TACTTAATTACTGCAGATCGATGCGCAAACTTCCAAATTTCTCTTTATATCCCGGGTTCTTCTTCTCATTCGCCTTACCTGACCCCACTCCCAAAAAAGAAATCGAAAATGATATTAAGAT
L.japonica	TCTC
	***
tabac1	TCTTGTTCAAAAACGTAATAAGAGAGTTGATTGATTGTTTTTCGTAAAAAGTCACTTTCTG
tabac2	TCTTGTTCARARACGTA-TARGAGAGTTGGTCTTCTCATARATAGTCACTAGCTTTCTG
tomate	TAGTGAACGGAGAGAGTAATTTCTATTGGAACGGAGAGTAATTTCTATTT-
A.thaliana	
Phaseolus	TTTTTAGAA-AATTAATGTAAATTGTGGTAGA
Petunia	TAGTGGGCCCCTAATAATGCTTATTATGACCATAACTCACTC
L.japonica	TCGTTCTCTTCAATTTC
tabac1	AGGTAAATAGTTACT-GATATTATAATATTTAATACCA-AACAAATGAAAGTAAAATATGTGTGTGTCTTTCATACATAT-A
tabac2	ACGTAAATAGGTACT-CAAATTATAAATATTACACCA-AACAAATGAAAATAGGATATGTGTTTTTCATACGTAT-A
tomate	TAGAGT-CAAACTATTA-AAATTTA-ACCA-ACA-ATCTCTCTTGTAA
A.thaliana	CA-ACCTCTC
Phaseolus	ATGTATTTATT-GATGCTTTCTAACAACA
Petunia	AAGCCAAAAAGACGCCATCCCCAGTACAATCTACCCCCCCC
L.japonica	TTTATAATATCCTTTTCGTGCAAGGAACTTCAAATGCA
tabac1	TTTATCTATC-ATAG-TTAATGATATATATATATATATATTTTAACCTTAAATTTTGACTA-CTAAAA-TGTAATTATATATTTGGGTAGATATCAGAT
tabac2	TTTATCTATC-GTAC-TTAATGATACATACATATACATATACATAT-AACCTTACTTTTGATTA-CTAAAAATTTAATTT
tomate	TTTAGTA-GTAT-TTTTCATATATAATTTTTGAATATCTAAAATTTTTAACTTTGAAAGTTAGTTA
A.thaliana	TTTACTCT
Phaseolus	TTTAATGAG-TG-GTATA
Petunia	TTCAAAGTTCTGTAGCTTCTGGCTCGTTTAATAAAGTTTTTATCATCAGGTTAAGATAATTTACAAAAGTATAAAATTGTCTAAAGTTAATATAAAATAAAATAGTTCTATGATATATACGTT
L.japonica	TTCAGCAAATGAAACACACTAATTGGATTAGCCAAAGACATTCCAAATAGAGGTAGATTCCAAATAGAGGTAGAAACACACACACTAATTGGATTAGCCAAAGACATTCCAAATAGAGGTAGAAACACACACACACTAATTGGATTAGCCAAAGACATTCCAAATAGAGGTAGAAACACACACACACACACACACACACACACAC
tabac1	GCCACTAAACATTTACCTAGCCACTCCTCCGAAAATAA
tabac2	GCCACAAAACATTTACCTAGCCACTGTTTTTGACTAACAAAATTTAATTAA
tomate	ACGTAACATGACA
A.thaliana	CATTCA
Phaseolus	TTACATGTRC-TTA
Petunia	GACTGTAAAATATGGATTGTTTGTACCAAGATTAATAATACGGGAATTGTTATACGTGAATAA

tabac1	ATTGAGAAGGAAATTAGAGTTAGTGGAGCCATAATAATGTTTAA	TGTGACCAT	AA CTCAGTGAAA	C
tabac2	ATTGAGAAGGAAATTAGAGTTAGTGGAGCCATAATAATGTTTAA	TGTGACCAT	AACTCGGTGAAAACCACGGCAAGAAT	AAGAAAC
tomate	ATAAATGAGGAAATTTCA	CA		
A.thaliana	GAGA	CCA	AAAA	
Phaseolus	AAGAATATGGAAAGTTTA	TAATACCAGTATA	ATAATTTTTGAAAAG	<b>A</b> C
Petunia	AT-AATACGAAAATTATGTTTAGATATTAGCTATTAAGGGTTTTTATTTTATTTTTAA	ATAATCTATATACATATTA(	CTATCTCCTCTTCGGTAAAATAA	TAC
L. japonica	-TTTTTCCTGAAAT	TAAAAACA		
	* **	**	***	
+-h1		N 3		
tabaci		I - ACCCCAATCCCCGCATC		
tabacz	AGCTGTTAAGGCTAACCAACAGCTGCATATCTTTAAGCCATTTGCTAT	rAccecategeate:	TUCTUTGATUCUGACUUTAUGGGUGTAAAAA	
tomate		AAC	GATAAAA	
A.thaliana	ATTTC	AC		
Phaseolus	AATGGGTGATAAGAGACGTTTGTTTT	GAGTGGGAC	A	
Petunia	ATGTACGTTATTCCTATA-ACTTATTCCAAATTTATAATTACAGGATTAGCTTTCCTTG	IGCATCCAAACCAAACC	ACCCCTGATGAAATAAAAACGT	FAACAAT
L.japonica	AGAGAAAAGATGTGATGT	CAC	TGAGTGAAG	
	* * *	*		
tabac1	GTGTAAATCATTAGAATTGTT-TTATTTT-GTGATG	FCACTATTTTTTTAAAATCI	AAATTAAATTGGGGGTGTCGATTTTTT	IGGGTCC
tabac2	GTGTAAATCGTTAGAATTGTT-TTATTTATTTATTT-ATGATG	PCACTATTTTTT-AAAATC	AAATTAAATTGGGGGTGTCGATTTTTT	IGGGTCC
tomate			<b></b>	-GGGTCC
A thaliana				
Phageolug				PC
Petunia		CCCCCATCATTTCCCA A MCC		reagree
I. japonica		T-ACTA A A ATTCTCA ACCC		Passac C
1. Juponiou	* * *	*	* * * *	
tabac1	CACTTATGTATAGTATGGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT	TCTATATAAGG	GCATT-CACAAA	CTTCG-
tabac1 tabac2	CACTTATGTATAGTATGGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT	ТСТАТАТААСС ТСТАТАТААСС	CCACCCCACGCATT-CACAAA	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G-
tabac1 tabac2 tomate	Cacttatgtatagtatggggggctatggagggcattgagggggggg	ТСТАТАТААСС ТСТАТАТААСС ТСТАТАТААС	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT-	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G-
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana	CACTTATGTATAGTATGGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT	TCTATATAAGG TCTATATAAGG TCTATATAAAG TCT-TAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT-	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- G-
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus	CACTTATGTATAGTATGGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCC	ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТААЗG ТСТ-ТАТ ТСТ-ТАТ	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CACCG	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- G- ATTTGC
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTC	ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТАААС ТСТ-ТАТ ТСТАТАТААЗТССССААТС ТСТАТАТААЗА	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAA- CC-ACCGCACT-CACAAAAC CCCTACAACTTCCCTCATT-CAAAAAC CCACCGCACGCAGT-CACAAA-	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G-
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTCT	ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТАААС ТСТ-ТАТ ТСТАТАТААЗТССССААТС ТСТАТАТААЗА ТСТАТАТААЗАТ	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CC-ACCGCACT-CACAAAAC CCCTACAACTTCCCTCATT-CAAAAAC CCACCGCACGCAGT-CACAAA- CCCCCAAACCCATGTTCCCATTGCCCAAAC	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- ATTTGC CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G-
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT	TCTATATAA3G TCTATATAA3G TCTATATAAAC TCT-TAT TCTATATAA3GTCCCCAATC TCTATATAA3GA TCTATATAAAATT- **** ***	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CCACCCGCACT-CACAAAACC CCCTACAACTTCCCGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAA- CCCCCAAACCCATGTTCCCATTGCCCAAAC- * *	CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- ATTTGC CTT <u>C</u> G- CTT <u>C</u> G- TGC *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTC CTTTCCTACCCTCCACCACGCTTCT TTGTTATGTACAGTATGGGG-CTATAGTTGCATTGAGAGAGAGTCCGTAACGTCCTAACTC TTCTTCTGTCCC	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAAG           TCT-TAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CC-ACCGCACT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAA- * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTCG- CTTCG- CTTCG- CTTCG- CTTCG- *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGA	TCTATATAAGG TCTATATAAGG TCT-TAT TCTATATAAGTCCCCAAT TCTATATAAGA TCTATATAAGA TCTATATAAAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CC-ACCGCACT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA CCACCGCACCATGTTCCCATTGCCCAAAC- * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTT <u>C</u> G- ATT <u>C</u> G- G- ATTTGC CTT <u>C</u> G- TGC *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGACCGTAACGTT	ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТАААС ТСТ-ТАТ ТСТАТАТААЗGТССССААТС ТСТАТАТААЗGА	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CC-ACCGCACT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAAC- * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTTGC CTTCG- CTTCG- * *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGACCGTAACGGT	ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТААЗG ТСТАТАТАААС ТСТ-ТАТ	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CCACCCCACACGCACT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAACC * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- IATTTGC CTTCG- CTTCG- *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGACCGTAACGGT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT TTGTTATGTACAGTATGGGG-CTATAGTTGCATTGAGAGAGAGTCCGTAACGTCTCTAACTC TTCTTCTGTCCCCAAAATCAAATCTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAATATTTTC TTCC	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAAC           TCT-TAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCAC	CTTCG- CTTCG- ATTCG- IATTTGC CTTCG- CTTCG- *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAAG	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CCCCTACAACTTCCCGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC * * ATCCCCAAACCCATGTTCCCATTGCCCAAAC- * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- IATTTGC CTTCG- CTTCG- TGC * T T T 
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCCTCT	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAAG           TCT-TAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CC-ACCGCACT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC * * ATCCCCCATGTTCCCATTGCCCAAAC ATCCCT-CTTT-CTTC	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTTGC CTTCG- CTTCG- TGC * T T T T T 
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGACCGTAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTCTCCACCACGCCTCT TTGTTATGTACAGTATGGGG-CTATAGTTGCATTGAGAGAGAGAGCCGTAACGTCCTAACTC TTCTTCTGTCCCGAAAATCAAATCTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAATATTTTC TTCCGAAAATCAAATCTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAAATATTTTC TTCCCAAACAGAACAAGAAAATCAAATCTCGGAGAGAGAG	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAAG           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAGA           TCTATATAAAAT           TCTATATAAAAT           AGAGAGAAAAT           AGAGAGAAAAT           AGAGAGAAAAT           AGAGAGAAAAT           AGAGAGAAAAT           TAGA           TAGAA           TAGAA	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CC-ACCGCACT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAAC CCACCGCACGCAGT-CACAAA- CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTTGC CTTCG- TGC * TGC TGC T T T T T T
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGAGCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT CCTTCCTACCCTCCACCACGCTTCT TTGTTATGTACAGTATGGGG-CTATAGTTGCATTGAGAGAGAGCCGTAACGTCTCTAACTC TTCTTCTGTCCC	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAGC	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CCACCGCACGCACT-CACAAA CCACCGCACGCAGT-CACAAAA CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT ATCTCT-CTTC-CTTC	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTGC CTTCG- CTTCG- TGC * T T T T ATAGGAT
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGGACGC-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT TTGTTATGTACAGTATGGGG-CTATAGTTGCATTGAGAGAGAGAGCCGTAACGTCTCTAACTC TTCTTCTGTCCC	TCTATATAAGG         TCTATATAAGG         TCTATATAAGC         TCT-TAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACCATGTTCCCATTGCCCAAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT ATCTCT-CTTC-CTTC	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTTGC CTTCG- CTTCG- * *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGGACGC-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT TTGTTATGTACAGTATGGGG-CTATAGTTGCATTGAGAGAGAGAGCCGTAACGTCTCTAACTC TTCTTCTGTCCC	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAAG           TCTATATAAGT	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT ATCTCT-CTTC-CTTC	CTTCG- CTTCG- ATTCG- IATTTGC CTTCG- CTTCG- *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT	TCTATATAAGG         TCTATATAAGG         TCTATATAAGC	CCACCCCACGCATT-CACAAA CCACCCCCACGCATT-CACAAA ACAACTCTCCGCACT-CACAAT CCACCGCACGCAGT-CACAAAAC CCACCGCACGCAGT-CACAAAAC CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT ATCTCT-TTTTTTTTTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- CTTCG- CTTCG- CTTCG- 
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT	TCTATATAAGG	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- IATTTGC CTTCG- CTTCG- * *
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGGAGCG-CTATGGAGGGCACTGAGAGAGACCGTAACGGT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT	TCTATATAAGG         TCTATATAAGG         TCTATATAAAG	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC * * ATCCCCAAACCCATGTTCCCATTGCCCAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- IATTGC CTTCG- CTTCG- TGC * T TT T ATAGGAT
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATGGCG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT	TCTATATAAGG TCTATATAAGG TCTATATAAGG TCT-TAT	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CCACCGCACGCAGT-CACAAAACC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- CTTCG- CTTCG- CTTCG- TGC * T T T T T T
tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica tabac1 tabac2 tomate A.thaliana Phaseolus Petunia L.japonica	CACTTATGTATAGTATGGGGGCTATGGAGGGCATTGAGAGAGTCCGTAACGTT TGCTTATGTATAGTATAGGACG-CTATGGAGGCACTGAGAGAGTCCGAAACGTT TACTTATGTACAGTAAATATGGGGTTGAGATAGTTCGTAACGGT CTTATCTCTCCCACCACGCTTCT	TCTATATAAGG           TCTATATAAGG           TCTATATAAGC           TCT-TAT           TCTATATAAGT	CCACCCCACGCATT-CACAAA- CCACCCCACGCATT-CACAAA- ACAACTCTCCGCACT-CACAAT- CCACCGCACGCAGT-CACAAAAC CCACCGCACGCAGT-CACAAAA- CCACCGCACCCATGTTCCCATTGCCCAAAAC * * ATCTCT-CTTT-CTT	CTTCG- CTTCG- ATTCG- ATTTGC CTTCG- TGC * T T T ATAGGAT

Figure 14: Alignement de promoteurs de gènes de nitrate réductase chez certains végétaux supérieurs. \* : nucléotide parfaitement conservé.

*gus* était faiblement exprimé dans des tabacs transgéniques. En effet, ils montrent que seuls 20% des tabacs transgéniques contenant les promoteurs de *nia*1 et *nia*2 montrent des niveaux détectables de l'expression du gène rapporteur. De plus, seules 10% de ces plantes sont régulées par le nitrate (Vaucheret *et al.*, 1992). Selon Jensen *et al.* (1996), chez le haricot, les éléments inducteurs seraient localisés au delà de -3500 et -1400 paires de bases pour les gènes *nia*1 et *nia*2 respectivement.

On a souvent parlé des limites de l'utilisation des plantes transgéniques pour l'étude des promoteurs de gènes *nia* chez les plantes supérieures (Vaucheret *et al.*, 1992). Des études d'expression transitoire pour contourner les problèmes rencontrés avec les plantes transgéniques ont été effectuées tant dans des protoplastes (Marion-Poll *et al.*, 1984) que par dans des expériences de bombardement de particules dans des feuilles excisées (Godon *et al.*, 1995). Cependant, à chaque fois les auteurs notent les problèmes rencontrés et les difficultés d'utiliser ces méthodes pour l'études des promoteurs de gène *nia*.

Dernièrement, Strater et Hachtel (2000) ont isolé le promoteur du gène de la nitrate réductase du bouleau. Ils montrent qu'une séquence de 1,6 kb de ce promoteur est fonctionnel dans les racines comme les feuilles. Des analyses de délétions du promoteur ont été effectuées avec le gène rapporteur *UidA* et introduits dans des plants de *Nicotiana plumbaginifolia*. Les auteurs ont montré la présence de régions nécessaires pour l'induction par le nitrate et la lumière (Strater et Hachtel, 2000).

Nous avons effectué des alignements de séquences de certains promoteurs de gène codant pour la nitrate réductase de végétaux supérieurs (figure 14). Il est intéressant de noter les faibles homologies entre les promoteurs alors que les séquences codantes sont bien conservées. Cependant, on peut trouver deux régions conservées: la première est située au niveau de la boîte TATA et la seconde au niveau des sites d'initiation de la transcription. On ne retrouve pas de conservation dans la position des séquences telles que les éléments supposés se lier avec les facteurs de transcription ou le motif commun aux promoteurs de gènes régulés par le nitrate par Hwang *et al.* (1997).



### Figure 15: Modèles de structures de facteurs de transcription.

(a) Le domaine hélice-coude-hélice est trouvé dans des protéines régulatrices procaryotiques ainsi que dans les protéines à homéodomaines des eucaryotes. L'hélice 3 est l'hélice de reconnaissance qui établit les contacts cruciaux avec l'ADN. Les hélices 1 et 2 se trouvent au dessus de l'hélice 3 et elles sont capables d'établir des contacts avec d'autres protéines. Dans certaines protéines à homéodomaines il existe une quatrième hélice.

(b) Le doigt de zinc. Sur la partie gauche se trouve un doigt de zinc comprenant deux cystéines et deux histidines reliées par un atome de zinc. Sur le côté gauche figure un modèle de cette structure protéique. On pense que l'hélice située à droite établit les contacts dans le grand sillon de la double hélice d'ADN.

(c) L'agrafe de leucine (ou "leucine zipper"). Les protéines à agrafe de leucines agissent sous forme de dimères comprenant deux sous-unités. On trouve à l'extrémité C-terminale de la protéine une région contenant les leucines rigoureusement situées tous les 7 acides aminés. Chacune de ces chaînes latérales de leucines se retrouvent le long d'une même face de l'hélice. On pense que cette fournit une surface hydrophobe impliquée dans la formation du dimère. Du côté N-terminal, il existe une région riche en acides aminés chargés positivement dont on pense que qu'ils établissent des liaisons avec la molécule d'ADN.

(d) Protéine de type hélice-boucle-hélice. Ces protéines contiennent deux hélices associées par une boucle de structure inconnue. Comme pour les agrafes à leucines, on pense que ces hélices fournissent une surface favorisant la formation des dimères. Une troisième hélice riche en acides aminés chargés positivement est responsable de la fixation de la protéine à l'ADN.

Avertissement: Dans ce travail de thèse, nous avons entrepris la caractérisation de protéines qui pourraient être des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de la NR par le nitrate. C'est pourquoi, en anticipation de la discussion des résultats obtenus, une étude bibliographique, non exhaustive, des facteurs de transcription végétaux est présentée ici.

# Deuxième partie : Les facteurs de transcription dans le règne végétal

# I. Classification des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription du règne végétal peuvent être classés selon les caractéristiques de leurs motifs structuraux. On dénombre ainsi pas moins de 11 familles de facteurs de transcription dont quelques modèles sont représentés dans la figure 15.

## (1) Les bZIP protéines (basic region leucine-zipper)

Cette famille de facteurs de transcription est trouvée chez de nombreux Eucaryotes. Elle est constituée de protéines contenant un motif d'environ 25 acides aminés riches en résidus basiques. Cette région basique, adjacente à une région appelée fermeture - leucine (leucine-zipper, ZIP), contient des résidus leucine tous les 7 résidus sur 3 à 6 unités répétées (Landschultz *et al.*, 1988). La région basique forme une hélice  $\alpha$  avec une périodicité de 3,5 résidus par tour lors de la liaison à l'ADN cible (Weiss *et al.*, 1990; O'Neil *et al.*, 1991; O'Shea *et al.*, 1991; Ellenberger *et al.*, 1992; Glover et Harrison, 1995). Les protéines bZiP sont très conservées au cours de l'évolution (Niu *et al.*, 1999). Deux sous-groupes majeurs se sont différenciés, selon la séquence nucléotidique reconnue. On parle en effet de boîte G (CCACGT<u>G</u>G) et de boîte C (TGACGT<u>C</u>A) (Niu *et al.*, 1999).

De nombreux facteurs bZIP ont été identifiés chez les plantes (pour revue, Meshi et Iwabuchi, 1995; Takatsuji, 1998). Toutes ces protéines bZIP se lient à des séquences nucléotidiques cibles contenant un noyau ACGT (Forster *et al.*, 1994b). Les séquences entourant ce noyau ACGT influencent très fortement l'affinité de la protéine pour l'ADN (Tabata *et al.*, 1991; Izawa *et al.*, 1993, 1994; Forster *et al.*, 1994b; Mikami *et al.*, 1994).

De nombreuses protéines bZIP s'expriment spécifiquement dans certaines cellules et s'agencent dans des combinaisons diverses. De plus, il semblerait qu'elles aient les mêmes séquences cibles. Ceci rend difficile l'identification des facteurs bZIP chez les

plantes. De plus, les éléments *cis* contenant les noyaux ACGT sont impliqués dans divers phénomènes comme dans les réponses à la lumière, le stress, les hormones, le cycle cellulaire etc. (de Vetten et Ferl, 1994; Forster *et al.*, 1994b). Ces éléments agissent généralement avec d'autres éléments contenant ou non le noyau ACGT (Shingh *et al.*, 1994; Sessa *et al.*, 1995; Shen et Ho, 1995).

### (2) *Les protéines bHLH* (hélice-boucle-hélice)

Comme pour les bZIP, le domaine bHLH est composé de deux sous-domaines, la région basique responsable dans la liaison avec l'ADN et la partie hélice-boucle-hélice (appelée HLH) pour la dimérisation. Des analyses de protéines bHLH de mammifères ont montré que la région basique forme une hélice  $\alpha$ , tandis que la région HLH est composée de deux hélices  $\alpha$  séparées par une boucle et forme les homo ou hétéro-dimères (Ellenberg *et al.*, 1994; Ma, 1994). Les protéines bHLH reconnaissent des séquences possédant un noyau consensus CANNTG. Les deux nucléotides centraux ainsi que les régions flanquantes de ce motif sont très importants pour la reconnaissance par les protéines bHLH.

Les protéines bHLH d'origine animales ont souvent un rôle crucial dans des phénomènes liés au développement comme la myogenèse, la détermination du sexe ou la neurogenèse (Jan et Jan, 1993; Murre *et al.*, 1994). Chez les plantes, les protéines bHLH de la famille R/B (Lc, B-Peru ou R-S) sont fonctionnellement semblables mais possèdent des expressions spécifiques selon les tissus (Consonni *et al.*, 1993). Elles régulent l'expression de gènes structuraux de la voie de biosynthèse des anthocyanes en combinaison avec les membres de la famille C1/MYB (Koes *et al.*, 1994).

### (3) Les protéines MYB

Les protéines MYB, définis comme les domaines se liant à l'ADN chez le protooncogène Myb sont constitués d'une répétition de trois copies d'un motif de 51 à 53 acides aminés comprenant trois résidus tryptophane espacés de 18 à 19 acides aminés (Ogata *et al.*, 1992;1994). Le premier motif répété n'est pas essentiel pour l'attachement à l'ADN, alors que les deux autres qui se lient à la séquence AACNG contiennent trois hélices  $\alpha$ . Contrairement aux animaux, les plantes possèdent de nombreuses protéines MYB ayant des fonctions très différentes (Avila *et al.*, 1993). La plupart des protéines MYB de plantes n'ont que deux copies de la séquence répétée qui correspondent aux deuxième et troisième

répétitions chez les animaux (Cone *et al.*, 1993; Wissenbach *et al.*, 1993). Un groupe de protéines MYB, comprenant C1, P, PL, Zm1 et Zm38 du maïs, MYB305 d'*Antirrhinum* et MYB.Ph3 du pétunia, semble être impliqué dans la régulation des gènes de biosynthèse du phenyl-propanoïde (pour revue Meshi et Iwabuchi, 1995). Chez *Arabidopsis thaliana*, une autre protéine MYB (ATMYB2) semble être impliquées dans la réponse à la déshydratation, au stress salin ou encore à l'ABA (Urao *et al.*, 1993).

### (4) Les protéines « homéodomaines » (HD)

Elles furent découvertes chez la drosophile, en particulier par l'étude des gènes qui régulent le développement (Gehring *et al.*, 1994a). Composées d'environ 60 acides aminés, elles sont repliées en une structure globulaire stable qui leur confère la propriété de s'accrocher à l'ADN (Gehring *et al.*, 1994a; 1994b). Elles contiennent trois hélices  $\alpha$  (1 à 3 à partir du domaine N-terminal) entrecoupées par des boucles.

Chez les plantes, la première protéine HD a été découverte chez le maïs (Vollbrecht *et al.*, 1991). Cette protéine (KN1) intervient dans le programme du développement de la cellule. Plus de 20 protéines constituent maintenant une classe caractérisée par une séquence consensus de 13 acides aminés dans l'hélice qui permet la reconnaissance de l'ADN et un bloc de 24 acides aminés riche en Glu, Leu et Lys qui précède le domaine HD que l'on nomme ELK (Kerstetter *et al.*, 1994).

Une autre classe de protéines HD a été identifiée chez *Arabidopsis* et la carotte, il s'agit des protéines homéodimère-fermeture (HD-Zip) (Ruberti *et al.*, 1991; Söderman *et al.*, 1994; Kawahara *et al.*, 1995). Ces protéines ont un domaine ZIP immédiatement après le domaine HD. Ces deux domaines sont nécessaires pour se lier à une séquence de 9 paires de bases CAAT(A/T)ATTG (Sessa *et al.*, 1993). Des protéines HD-Zip d'*Arabidopsis* semblent impliquées dans le contrôle de la croissance (HAT4, Athb-2 et Athb-4) (Carabelli *et al.*, 1993 ; Schena *et al.*, 1993) ou semblent avoir un rôle majeur dans les plantes matures (Athb-5, Athb-6 et Athb-7) (Söderman *et al.*, 1994).

## (5) La famille des MADS-box

Le nom de MADS vient de la première lettre des quatre premiers membres isolés(Schwaerz-Sommer et al., 1990):- MCM1Dolan et Fields, 1991

- AGAMOUS Yanoksky *et al.*, 1990
- DEFICIENS Sommer *et al.*, 1990

- SRF

### Treisman, 1992

Le motif des MADS-box est composé de 56 acides aminés, et il apparaît très fortement conservé entre les différentes séquences (Shore et Sharrocks, 1995; Theissen *et al.*, 2000). Les MADS-box peuvent être divisées en deux sous-régions, l'une N-terminale riche en résidus basiques et hydrophiles est impliquée dans la liaison à l'ADN. L'autre, C-terminale, est riche en résidus hydrophobes. La séquence d'ADN reconnue par ces protéines est  $CC(A/T)_6GG$ .

Les gènes codant pour les MADS-box représentent une famille très large chez les plantes, et sont généralement impliqués dans la régulation du développement floral ou végétatif (Ma 1994; Weigel et Meyerowitz, 1994).

Dans des racines d'*Arabidopsis thaliana*, un ADNc (ANR1) isolé en condition d'induction par le nitrate, présente de fortes homologies avec la famille des MADS-box (Zhang et Forde, 1998). ANR1 est impliqué dans le développement de la racine en réponse au nitrate en augmentant l'élongation des racines latérales (Zhang et Forde, 2000).

Notes: -la famille des MADS-box est trop importante pour être détaillée ici. Reportez vous, pour une revue récente et détaillée, à Theissen *et al.*, 2000: «A short history of MADS-box genes in plants».

-les MADS ont également leur site sur Internet: http://www.mpiz-koeln.mpg.de/mads/

## (6) Les protéines avec un motif zinc

Dans les structures de ces protéines, un ou plusieurs ions zinc sont impliqués dans le maintien de la structure tertiaire (Klug et Schwabe, 1995). Le motif zinc classique est composé de deux résidus Cys et deux résidus His conservés qui se lient à un ion zinc (Hayes et Tullius, 1993). Le doigt de zinc est composé d'environ 30 acides aminés avec un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ . En plus des résidus Cys et His, plusieurs acides aminés hydrophobes sont fortement conservés dans le doigt de zinc. Il semble que se soit la région de l'hélice  $\alpha$  qui soit impliquée dans la liaison avec l'ADN (Fairall *et al.*, 1993).

Il existe deux classes de motif en doigt de zinc. La première, avec les groupes TFIIIA et GATA, comprend les domaines de liaison à l'ADN et semble impliquée directement dans la reconnaissance de la séquence d'ADN. Alors que la seconde, avec les groupes LIM- et RING-doigt, semble être impliquée dans les interactions protéines-protéines (pour revue : Takatsuji, 1998).

La première protéine de type TFIIIA à doigt de zinc isolée chez les plantes (EPF1) était impliquée dans les mécanisme de régulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement des pétales chez le pétunia (Takatsuji *et al.*, 1992). La famille EPF du pétunia, caractérisée par une séquence protéique consensus QALGGH, comprend plus de 30 protéines qui semblent impliquées dans le développement des anthères et du pollen (pour revue : Takatsuji, 1998). Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine de type TFIIIA la mieux caractérisée est SUPERMAN, impliquée dans le développement de la fleur (Sakai *et al.*, 1995).

La famille GATA-1 est caractérisée pour se lier spécifiquement à la séquence d'ADN GATA et par la présence de deux motifs  $C-X_2-C-X_{17}-C-X_2-C$  contenant un atome de zinc. La première protéine appartenant à cette famille a été identifiée comme un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes de globine humain (Pevny *et al.*, 1991). Chez le tabac, une protéine NTL1 a été identifiée (Daniel-Vedèle et Caboche, 1993) comme étant un homologue de NIT2, un facteur de transcription chez *Neurospora crassa* (Feng *et al.*, 1993). Il existe 60 % d'identité entre le doigt de zinc de NTL1 et NIT2, comme avec les doigts de zinc des protéines GATA-1 des animaux et des levures. Les deux résidus Cys chez NTL1 sont séparés par 18 aa. Cependant, la preuve que NTL1 soit impliquée dans la régulation de l'assimilation du nitrate n'a toujours pas été faite.

### (7) Les protéines contenant les motifs boîte-HMG et crochet-AT

Les protéines à haute mobilité (HMG) sont les protéines non-histones les plus abondantes trouvées dans le noyau (Grasser, 1995). On les divise en trois familles en se basant sur des motifs structuraux.

Les deux premières familles contiennent la boîte HMG, composée d'environ 80 acides aminés (Grasser, 1995). Il a été suggéré que les protéines qui contiennent une boîte HMG ont un rôle architectural dans l'assemblage des complexes nucléo-protéiques, en permettant l'interaction entre différentes protéines (Tjian et Maniatis, 1994).

La troisième famille est constituée de petites protéines de 10 000 daltons. Elles contiennent trois copies d'un motif de 11 acides aminés appelé crochet-AT (Churchill et Travers, 1991). Le crochet-AT se lie à un motif d'ADN riche en adénosine et tyrosine. Comme pour la boîte HMG, les protéines possédant un crochet-AT modulent la structure de l'ADN.

## (8) Les facteurs heat shock (HSFs)

Les gènes « heat shock » sont induits non seulement en condition de stress thermique mais aussi par diverses conditions qui causent l'accumulation anormale de protéines. Leur régulation implique l'interaction entre un élément spécifique du promoteur, appelé élément « heat shock » (HSE), et le facteur de transcription correspondant, appelé HSFs (Lis et Wu, 1993; Scharf *et al.*, 1994; pour revue: Nover *et al.*, 1996). La séquence consensus sur le promoteur est NGAAN. Le domaine N-terminal des HSFs, se liant à l'ADN, est très bien conservé au niveau de sa séquence (Harrison *et al.*, 1994). Le domaine actif est localisé près du domaine C-terminal et son activité dépend du degré de polymérisation des oligomères.

La comparaison des différentes HSFs isolés chez les plantes permet de les classer en deux classes majeures divisées en deux sous-classes (Nover *et al.*, 1996).

### (9) Domaine AP2/EREBP

Chez le tabac, une petite famille de protéines, nommée EREBPs (Ethylene Responsive Element Binding Protein), et qui se lie sur la boîte GCC de différents promoteurs (en réponse au stress éthylène) a été identifiée (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995). Récemment, le gène APETALA2 a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* (Jofuku *et al.*, 1994). Le produit de ce gène, AP2, contient deux copies d'une unité de 68 acides aminés (appelé domaine AP2). Le domaine AP2 et le domaine de liaison à l'ADN d'EREBPs montrent de nombreuses similitudes, au point de parler de domaine AP2/EREBPs (Weigel, 1995). De nombreuses protéines comportent un domaine AP2/EREBPs, indiquant qu'il s'agit d'une famille multigènique avec différents fonctions (Weigel, 1995).

### (10) Domaine GT-1a/GT-2

La protéine GT-1a du tabac se lie à la boîte II (GTGTGGTTAAT), un élément important dans la réponse à la lumière dans le promoteur *rbcS-3A* du pois (Gilmartin *et al.*, 1992; Perisic et Lam, 1992). Le domaine de liaison à l'ADN de GT-1a et de GT-1, son homologue chez *Arabidopsis thaliana*, comportent quatre hélices  $\alpha$  (Gilmartin *et al.*, 1992; Hiratsuka *et al.*, 1994; Lam, 1995).

Les protéines GT-2 du riz et d'Arabidopsis thaliana contiennent deux domaines de liaison à l'ADN avec une triple hélice (Dehesh et al., 1990, 1992; Kuhn

1993). Les domaines N-terminal et C-terminal se lient préférentiellement aux boîtes GT3 (GGTAAAT) et GT2 (GGTAATT) respectivement (Dehesh *et al.*, 1992).

### (11) Les protéines avec d'autres motifs

Des protéines avec des motifs  $\beta\alpha\alpha$  (brin  $\beta$  et deux hélices  $\alpha$  dans le domaine de liaison à l'ADN) telles que PS-IAA4 et PS-IAA6 (induits par l'AIA chez *Pisum sativum*) montrent des similitudes avec des protéines codées par des gènes induits par l'auxine (Abel *et al.*, 1994; Napier et Venis, 1995). On peut également trouver une protéine VP1 qui active la transcription en synergie avec des facteurs de transcription en réponse à l'ABA (Hattori *et al.*, 1992).

# **II**. Domaines d'activation

Les activateurs de transcription sont généralement modulés au niveau structural et leurs domaines spécifiques peuvent fonctionner indépendamment, ils peuvent se repositionner sur la protéine ou changer de protéine sans perte de fonction (Ptashne, 1988). Les études menées sur les facteurs de transcription dans le domaine animal et chez les levures ont révélé de nombreux types de domaines d'activation. Parmi ceux-ci, les domaines d'activation de GAL4 et VP16 sont fonctionnels chez les plantes (Goff *et al.*, 1991).

Peu de domaines d'activation ont été révélés chez les facteurs de transcriptions végétaux. La région acide proche du domaine C-terminal de la protéine C1 de maïs possède un domaine d'activation potentiel pour activer la transcription (Goff *et al.*, 1991). Une analyse de sa structure par insertion / excision de transposon suggère que la formation d'une hélice  $\alpha$  dans le domaine d'activation est plus importante qu'une forte charge négative (Franken *et al.*, 1994). Les régions acides des protéines HSF de la tomate, O2 et VP1 du maïs, et OSH du riz montrent également un domaine d'activation (McCarty *et al.*, 1991; Treuter *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 1993; Tamaoki *et al.*, 1995).

Les éléments de réponse à l'auxine (AuxREs) du promoteur GH3 chez le soja sont nécessaires mais pas suffisants pour l'expression des gènes inductibles par l'auxine (Ulmasov *et al.*, 1995). Les séquences promotrices entourant les AuxREs sont constitutivement actives même quand les éléments AuxREs sont délétées ou mutées. L'utilisation du site de liaison à l'ADN de GAL4 couplé avec AuxRE est déréprimé en présence d'auxine (pour revue: Guilfoyle *et al.*, 1998)

Très peu de choses sont connues sur les mécanismes moléculaires d'activation de la transcription chez les plantes. TGA1a est la seule protéine à avoir été identifiée pour augmenter le nombre de complexes de pré-initiation (Katagiri *et al.*, 1990; Yamazaki *et al.*, 1990). Les connaissances sur les facteurs de transcriptions basiques sont également très pauvres, en effet, seule TBPs a été identifiée chez des espèces végétales (Gasch *et al.*, 1990; Vogel *et al.*, 1993). Les systèmes de transcription chez les végétaux sont actuellement fortement étudiés (Frohmeyer *et al.*, 1994; Fan et Sugiura, 1995; Zhu *et al.*, 1995) ce qui permettra de comprendre l'activation de la transcription.

# III. Modulation de l'activité des facteurs de transcription

Les modifications post-transcriptionnelles apparaissent importantes pour moduler l'activité des facteurs de transcriptions. Chez les levures et les animaux, on a montré que les facteurs de transcription sont modulés par des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation (Hille et Treisman, 1995; Hunter, 1995). Les facteurs de transcription étant des cibles majeures de différentes voies de transduction de signal que des kinases et phosphatases régulent, l'identification des kinases et de leurs cibles seraient nécessaires pour comprendre le contrôle de l'expression des gènes. Chez les plantes, de nombreuses publications montrent que les activités de liaison à l'ADN dans les extraits nucléaires sont modulées par phosphorylation (par exemple: Takase et al., 1991; Sun et al., 1993; Desprès et al., 1995; Sessa et al., 1995; Meshi et al., 1998).

Les facteurs de transcription fonctionnent dans les noyaux, donc leurs activités peuvent être contrôlées au niveau du transport nucléaire. Des signaux de localisation nucléaire (SLN) ont été localisés dans les régions basiques de protéines de type b-ZIP: TGA1a, TGA1b et O2 (van der Krols et Chua, 1991; Varagona *et al.*, 1992) et dans le domaine de liaison à l'ADN de GT2 du riz (Dehesh *et al.*, 1995). O2 possède un autre SLN en dehors du domaine de liaison à l'ADN, il a été montré que les deux SLN sont indispensables à l'adressage dans le noyau (Varagona *et al.*, 1992, 1994). Dans PS-IAA4 et PS-IAA6, deux SLN ont été identifiés (Abel et Theologis, 1995).

Bien que de nombreux facteurs de transcription aient été identifiés dans les dernières années, les mécanismes de régulation sont encore mal connus. Les cibles de nombreux facteurs isolés ne sont encore que putatives et les gènes cibles ne sont pas encore identifiés.

En général, la région régulatrice d'un gène contient de nombreux éléments agissant en *cis* (Dynan, 1989). Cela signifie que de nombreux facteurs agissant en *trans* sont impliqués dans la régulation d'un gène. Ces facteurs formeraient un complexe sur une région définie du promoteur. Un tel complexe implique certainement des facteurs dont la composition et la structure tertiaire seraient altérées par des stimuli externes et/ou internes. On sait que le même facteur de transcription peut être utilisé comme activateur ou répresseur, et ceci selon sa concentration dans le noyau ou selon les autres facteurs avec lesquels il agit (Fedoroff *et al.*, 1995).

Matériel et Méthodes



*Figure 16: Répartition géographique des régions d'origine de la chicorée (en rouge) ainsi que des régions de grande culture (en vert).* 

Pays	Production en t / an	% de la production de la CEE
France	250 000 t	56,5 %
Dont Nord-Pas de Calais	137 500 t	31,25 %
Belgique	100 760 t	22,7 %
Pays Bas	88 880 t	20,1 %
Suisse	2 000 t	0,4 %
Espagne	1 320 t	0,3 %

Tableau 2:Les principaux pays producteurs d'endive et leurs productions par rapport à<br/>celle de la CEE (440 000 t/an). (données CTIFL, 1995).

# Matériel et méthodes

# I. Matériel Végétal

## La chicorée de Bruxelles

On retrouve les premières traces de la culture de la chicorée en 4000 avant JC sur les bords du Nil. La culture de cette plante, d'abord appréciée pour ses vertus médicinales, se répand rapidement autour du bassin méditerranéen puis, peu à peu, en Europe (figure 16). La production du chicon revêt une importance économique très importante dans la région Nord-Pas-De-Calais. En effet, la production régionale s'élève à plus de 30% de la production totale de la Communauté Economique Européenne (tableau 2). Cependant, il faut noter ces dernières années une augmentation de la culture de la chicorée pour la production de sucres issus de la racine tubérisée (inuline et fructose).

Le genre *Cichorium* regroupe une dizaine d'espèces dont trois sont principalement rencontrées en Europe : *Cichorium spinosum*, *C. endiva* et *C. intybus*. *C. intybus* est l'espèce la plus diversifiée au point de vue agronomique. On en distingue deux sous unités :

ssp. sativum dont la racine est destinée à l'industrie.

ssp. *foliosum* dont les feuilles sont consommées en salade. Parmi cette sous-espèce on rencontre la chicorée de Bruxelles.

La chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L. var. Witloof; 2n = 2x = 18) est une plante pérenne de la famille des *Asteraceae*. Son cycle de développement est bisannuel. Lors de la phase végétative, il y a formation, en fin de première année, d'une racine tubérisée avec une rosette de feuilles. Durant cette période de croissance végétative, la racine accumule des réserves azotées (40 % protéines et 60 % acides aminés) et carbonés (Limami *et al.*, 1993). Au cours du cycle naturel, les réserves accumulées sous forme d'inuline lors de la première année sont remobilisées au printemps suivant pour aboutir à la formation d'une hampe florale qui produira les graines. L'appareil reproducteur présente une allogamie stricte et la pollinisation est de type entomophile (Limami et Laville, 1991). Cependant, ce cycle peut être interrompu en fin de phase végétative par la récolte des racines. Celles-ci sont conservées à basse température (0°C), puis forcées en enceintes climatisées (16°C) à l'obscurité et sous humidité saturante. Un bourgeon étiolé

Macro-éléments	Concentration en g.
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
$CaCl_2, 2H_2O$	440
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

*Composition de la solution de macro-éléments du milieu de Murashigue et Skoog.* 

Micro-éléments	Concentration en g.t <sup>1</sup>
$CoCl_2,  6H_2O$	0,025
$CuSO_4, 5H_2O$	0,025
FeNa-EDTA	36,70
$H_3BO_3$	6,20
KI	0,83
$MnSO_4, 4H_2O$	16,90
$Na_2MoO, 2H_2O$	0,25
$ZnSO_4, 7H_2O$	8,60

*Composition de la solution de micro-éléments du milieu de Murashigue et Skoog.* 

Tableau 3:Composition des solutions de macro et microéléments pour la réalisation du<br/>milieu de Murashigue et Soog.



Figure 17: Culture cellulaire de Cichorium intybus en agitation rotative.

se développe en moins de trois semaines, celui-ci constitue l'endive commerciale (« chicon »).

### Mise en culture

Avant de mettre les graines en culture, on réalise une aseptisation afin de ne pas contaminer le milieu de culture par des microorganismes. Après avoir été immergées dans une solution de SDS à 1% pendant une minute, les graines sont rincées avec de l'eau stérile, et ensuite stérilisées dans une solution de chlorure mercurique (0,1%) pendant huit minutes. Après cinq bains successifs dans de l'eau stérile (1, 5, 10, 15, 30 minutes), les graines sont mises à germer en lumière continue (1,5 kWm<sup>-2</sup>, Cool White Deluxe) à 20°C±1°C sur un milieu de Murashige et Skoog (1962) sans addition d'hormones (tableau 3).

## Cultures cellulaires

La suspension cellulaire a été obtenue à partir de cals initiés a partir d'explants racinaires de *C. intybus* L. var. Witloof (Dubois *et al.*, 1988). Les sous-cultures sont obtenues par ensemencement de cellules âgées de 15 jours : ces dernières sont filtrées sur des tamis en inox de maille de taille décroissante (1mm et 50  $\mu$ m). Environ deux grammes de ces cellules sont transférés dans 200 mL de milieu Murashige et Skoog (1962) frais, contenant 58,4 mM de saccharose, 0,55 mM d'inositol, 5,4  $\mu$ M d'ANA, 90 nM de 2,4-D et 90 nM de kinétine. Les cellules poussent dans des conditions de photopériode de 16 heures de lumière (1,5 kW.m<sup>-2</sup>, daylight F400, General Electric) à 24°C et 8h d'obscurité à 22°C sur des agitateurs rotatifs (70 rpm) inclinés à 40° (figure 17).

# II. Matériel bactérien

### Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie Gram négatif vivant dans le sol. Nous avons utilisé la souche pMP90Gin qui nous a été fournie par L. Jouanin (INRA, Versailles). C'est une souche C58C1 contenant un plasmide pMP90Gin porteur d'un ADN de transfert dans lequel est inséré un gène rapporteur *uid*A contenant un intron et codant pour la  $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli* (Vancanneyt *et al.*, 1990) et un gène de sélection codant pour la néomycine phosphotransférase (*npt*II). L'intégration de l'ADN-T dans le génome des cellules confère la résistance à la kanamycine (*npt*II). L'activité  $\beta$ - glucuronidase est testée par l'apport d'un substrat chromogène ( $\beta$ -indolyl-glucuronide) ou fluorescent (méthyl-umbellyferrone glucuronide).

## Escherichia coli

*Escherichia coli* est une entérobactérie à Gram négatif fréquemment utilisée en biologie moléculaire en tant qu'hôte biologique de plasmides contenant des gènes ou des fragments de gènes utilisables comme sondes moléculaires. Cette bactérie contient son information génétique sous forme d'un chromosome comportant environ 4 millions de paires de bases. Certaines souches d'*E. coli* contiennent un plasmide dans le cytoplasme. Nous avons notamment utilisé la sonde DH5α (*supE44 •lacUI69(•80 lacZ•M15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1*) pour l'obtention de bactéries compétentes.

# III. Analyses moléculaires

## Extraction de l'ADN génomique végétal

L'extraction de l'ADN génomique se fait selon la méthode de Dellaporta *et al.* (1983). Les feuilles (5 à 8 grammes) sont broyées en présence d'azote liquide et reprises dans 150 mL de tampon d'extraction (100 mM TrisHCl pH 8; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β-mercapto-éthanol) auquel on ajoute 10 mL de SDS 20%. Le tout est vigoureusement mélangé et incubé à 65°C pendant 15 minutes. La plupart des polysaccharides et des protéines sont éliminés dans un précipité de dodécyl sulfate de potassium après addition de 50 mL d'acétate de potassium 5 M et une incubation de 20 minutes dans la glace. Après une centrifugation (4500g, 20' à 4°C), le surnageant est clarifié par filtration sur Miracloth (Calbiochem). Les acides nucléiques sont précipités par 0,8 volume d'isopropanol pendant 30 minutes à -20°C. Après centrifugation (15000g, 30' à 4°C), puis lavage à l'éthanol 70%, le culot est repris dans du TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM).

On peut ensuite purifier l'ADN par ultracentrifugation (53000 RPM, rotor Ti70; 18 heures; 15°C) sur gradient isopycnique de chlorure de césium à une concentration de 1,125 g/mL (en présence de BET). L'ADN, visible sous UV sous forme d'un anneau, est prélevé et purifié de nouveau sur un deuxième gradient de chlorure de césium. Le BET est éliminé par lavage au n-butanol saturé en eau, puis l'ADN est précipité par 0,3 M d'acétate de sodium (pH 4,8) et 2,5 volumes d'éthanol absolu. On effectue ensuite une centrifugation de 30' à 4°C et 15000g, le culot est lavé à l'éthanol 70% puis séché. Il est ensuite resuspendu dans de l'eau stérile ou du TE.

## Extraction d'ADN plasmidique

### Minipréparation d'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique se fait selon la technique décrite par Birnboim et Doly (1979). On ensemence 1,5 mL de milieu LB (tableau 4), supplémenté d'un antibiotique, avec une colonie bactérienne isolée contenant le plasmide à extraire. La culture bactérienne pousse sous agitation vigoureuse pendant une nuit à 37°C. Le culot bactérien est récupéré après centrifugation (10 minutes à 10000g) puis resuspendu dans un tampon 25 mM TrisHCl pH 8 contenant 50 mM de glucose et 10 mM EDTA pendant 5' à température ambiante puis 2' dans la glace. Ces cellules sont ensuite lysées dans une solution de NaOH 0,2 N et SDS 1% pendant 10' à 4°C. Après cette lyse alcaline des cellules, on neutralise et on précipite les protéines avec une solution d'acétate de potassium 3,1 M et d'acide acétique glacial 11,5 %. L'ADN plasmidique est enfin purifié par traitement au phénol et ensuite précipité à l'éthanol 95 %. Le plasmide purifié est resuspendu dans de l'eau stérile ou du TE.

## Maxipréparation d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique en plus grandes quantités se fait selon le protocole des colonnes échangeuses d'anions Qiagen (Qiagen Inc, USA). Après centrifugation (5000g, 15 min à 4°C), les 200 mL de bactéries sont resuspendues dans 10 mL de tampon P1 (100 µg / mL RNase A, 50 mM TrisHCl pH 8; 10 mM EDTA), puis lysées dans 10 mL de tampon P2 (200 mM NaOH, 1% SDS). Afin de précipiter les protéines et l'ADN chromosomique, on ajoute 10 mL de tampon P3 (3 M acétate de potassium pH5,5). Une colonne Qiagen est équilibrée par un tampon QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7; 15% éthanol; 0,15% Triton X-100). Après centrifugation de l'extrait, le surnageant contenant l'ADN plasmidique est alors chargé sur cette colonne qui sera lavée - pour éliminer les contaminants de la préparation comme les hydrates de carbone par un tampon QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7; 15% éthanol). Finalement l'ADN est élué à l'aide de 15 mL de tampon QC (1,25 M NaCl; 50 mM TrisHCl pH 8,5; 15% éthanol). Le plasmide ainsi purifié est précipité avec 10,5 mL d'isopropanol puis centrifugé (9500g, 30 min à 4°C). Finalement l'ADN est resuspendu dans de l'eau stérile.

## Quantification de l'ADN

On estime la concentration en acides nucléiques par dosage spectrophotométrique (KONTRON Instruments, UVIKON 930). La lecture d'absorbance se fait à



*Figure 18: Représentation schématique des transfert d'acides nucléiques par la méthode de Southern blot (ADN) et Northern blot (ARN).* 

### Matériel et méthodes

260 nm, où une densité optique (DO<sub>260</sub>) égale à 1 correspond à 50  $\mu$ g/mL d'acide désoxyribonucléique double brin. On effectue également des lectures d'absorbance à 230 et 280 nm, longueurs d'ondes auxquelles les sucres et les protéines ont respectivement leur maximum d'absorption. Il est intéressant de réaliser de telles mesures pour définir le degré de pureté de l'ADN. En effet si les rapports DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> et DO<sub>260</sub>/DO<sub>230</sub> s'approchent de 2, on peut considérer l'ADN comme pur.

### Transfert de l'ADN par la technique de SOUTHERN Blot

Le transfert d'ADN est réalisé selon la méthode décrite par Southern (1975) (figure 18). L'ADN, digéré par les enzymes de restriction, est déposé en gel d'agarose afin de réaliser une électrophorèse. L'ADN contenu dans le gel est dénaturé (45 min, NaCl 1,5M; NaOH 0,5N), puis neutralisé (45 min, TrisHCl 1M; NaCl 1,5M; pH 8), il est ensuite transféré sur membrane de nylon chargée (Bioprobe, Biohylon Z+) selon Southern (1975). Pour le transfert de fragment d'ADN de grandes tailles, le gel est d'abord soumis à une dépurination pendant 15 minutes dans un bain d'HCl 0,25 N avant dénaturation et neutralisation.

Le transfert s'effectue dans un tampon 10 x SSC (Citrate de sodium 0,15 M; NaCl 1,5 M; pH 7) pendant une nuit. Après transfert, les acides nucléiques sont fixés sur la membrane par chauffage à 80°C pendant 2 heures ou par passage au UV pendant 4 minutes.

### Extraction des ARN

Après broyage dans l'azote liquide, le matériel végétal est resuspendu dans un tampon guanidine à 5 mL/g MF. Après incubation dans la glace pendant une dizaine de minutes, une centrifugation (8500g, 20 min à 4°C) est effectuée afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite purifié par une série de phénol-chloroforme-alccol isoamilique, puis par une extraction au chloroforme-alccol isoamilique. Après une nuit à -20°C, le culot obtenu par centrifugation (8500g, 20 min à 4°C) est repris dans 4mL de tampon NETS (tableau 5). S'ensuit une phase de purification par phénol-chloroforme-alccol isoamilique, puis par chloroforme-alccol isoamilique. Les acides nucléiques sont alors précipités dans 1/20 de volume NaAc 3M (pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol. Après une incubation d'au moins deux heures à -20°C puis une centrifugation (15000g, 30 min à 4°C), le culot d'acides nucléiques est séché puis repris dans un volume minimum de TE. Les ARN sont alors précipités par une solution de chlorure de lithium à 4M une nuit à

Solution		Q	uantité		
Guanidine Tris HCl pl H <sub>2</sub> O	thiocyanate H 7,5	e 50 10 qs	) g ) mL p 100 ml	Ľ	

Composition du tampon guanidine pour l'extraction des ARN.

Solution	ea	Quanti	té –	
NaCl	11 0	0,1 M		
EDIA P. Tris HC	но lpH 7,5	10  mM		
Sarkosyl		0,5 %		

Composition du tampon NETS pour l'extraction des ARN.

Solution	Gertade - Sa		$\varrho$	uantité	
MOPS pH NaAcétate EDTA pH	7 (NaOH 8	<b>D</b>	0, 5( 1	2 M ) mM mM	

Composition du tampon MOPS x 10 pour l'extraction des ARN.

,	S	0	h	ıt.	ic	)	2											÷.,	ļ	0	u	a	11	<u>t</u>	it	é							
	N N E	la la L	2C 2F 27	Ϊ Ι, Γ/	<b>P</b> 4	РС Р		l I I	) 8	Ŧ	7	, , , `	5						( (	3, ), 2(	6 2 2	[] ] n	N N n	1 1 N	1								

Composition du tampon SSPE x 20 pour l'extraction des ARN.

Tableau 5:Composition des tampons guanidine, NETS, MOPS et SSPE pour l'extraction<br/>des ARN.

4°C. Après centrifugation, le culot obtenu est lavé par de l'éthanol à 80%. Une fois le culot séché, il est repris dans de l'eau.

### Transfert des ARNm par la technique de NORTHERN Blot

Les échantillons d'ARN sont dénaturés (20  $\mu$ g d'ARN dans 50% formamide ; 1 x MOPS pH 7; 2,2 M formaldéhyde) 5 minutes à 65°C puis sont déposés sur un gel d'agarose dénaturant de formaldéhyde (1,2% agarose ; 1 x MOPS et 2,4 M formaldéhyde). Après une migration de 5 heures à 80 volts dans un tampon 1 x MOPS, les acides nucléiques sont transférés sur membrane de nylon. Le Northern blot est réalisé dans des conditions comparables au Southern blot, dans un tampon de 10 x SSPE (1,8 M NaCl ; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5 et 10 mM EDTA). Après un transfert d'au moins six heures, les ARNm sont fixés sur la membrane par chauffage à 80°C pendant deux heures.

# **IV.** Hybridations moléculaires

## Purification et marquage des sondes

Les ADN utilisés comme sondes sont marqués au <sup>32</sup>P par extension d'amorce selon la technique de synthèse aléatoire décrite par Feinberg et Vogelstein (1983,1984) à l'aide du kit MultiPrime de Pharmacia.

Un aliquote d'ADN (50 ng) est diluée dans un tampon TE (pH 8) dans un volume final de 35  $\mu$ L. Après dénaturation (5 minutes à 100°C, puis refroidissement dans la glace), la réaction de marquage est effectuée à 37°C pendant 15 minutes en présence de 10 $\mu$ L de mélange réactionnel 5 x, 4  $\mu$ L d'isotope radioactif (50  $\mu$ Ci de dCTP <sup>32</sup>P 3000 Ci / mmol) et 1 $\mu$ L d'ADN polymérase du bactériophage T7 (4-8 U/ $\mu$ L). La réaction de polymérisation est stoppée par addition de 2 $\mu$ L d'EDTA 0,5 M pH 8.

L'ADN ainsi marqué est purifié sur une colonne de Séphadex G50 par élution avec deux fois 600  $\mu$ L de tampon TE. Les nucléotides non incorporés lors de la polymérisation sont retenus par la colonne. On choisit parmi les fractions collectées (aliquotes de 100  $\mu$ L), celles qui sont les plus radioactives à l'aide d'un compteur Geiger qui mesure l'intensité du marquage (Brown, 1991). L'intensité globale obtenue est de l'ordre de 2000 cpm.

### Hybridation

L'hybridation des acides nucléiques fixés sur la membrane avec la sonde marquée au <sup>32</sup>P est faite selon la méthode de Hames et Higgins (1985). Elle nécessite une étape préliminaire de préhybridation. Celle-ci s'effectue dans un tampon composé de 50%

Solution		<b>.</b>	Quant	tité	
Ficol Polyminy	Invralida	••	10 g		
SAB	ipyroitaor	<i>i</i> e	10 g		
H,0			qsp 25	50 mL	

Tableau 6:Composition de la solution de Denhart's x 100.



La région d'ADN inconnue est devenue interne à la région connue

- Région d'ADN connue
- Région d'ADN inconnue
- → Oligonucléotides

Figure 19: Principe de la PCR-Inverse

de formamide déionisée, 5 x SSC, 5 x Denhardt's (tableau 6), 50 mM phosphate de sodium (pH 6,8), 0,1% SDS et 100  $\mu$ g / mL d'ADN de sperme de hareng. Cette étape se fait en tube dans un four à hybridation à une température de 42°C pendant 3 à 6 heures.

L'hybridation, avec la sonde dénaturée (5 min à 100°C puis refroidissement rapide), est réalisée dans un tampon phosphate de sodium (pH 6,8) 20 mM, avec 50% de formamide, 5 x SSC, 1 x Denhardt's, 0,2% SDS, 10% sulfate de dextran (PM 500K) et 100  $\mu$ g / mL d'ADN de sperme de hareng. On effectue l'hybridation pendant une nuit.

Après 12 heures d'hybridation, la membrane est lavée une fois avec un tampon 6 x SSC et 0,1% SDS pendant 15 minutes à 42°C dans le tube à hybridation, puis avec le même tampon à une température de 55°C pendant 15 minutes, dans un volume plus grand. Le lavage est poursuivi ou non selon l'intensité des signaux émis par la membrane par un lavage avec du tampon 2 x SSC, 0,1% SDS ou même 0,1 x SSC, 0,1% SDS.

La membrane est ensuite enveloppée dans une feuille de plastique (Saran Wrap). L'autoradiographie s'effectue par contact avec un film (Kodak XO-MAT) à -80°C en présence d'un écran intensifiant. La durée d'exposition varie de 2 à 8 jours.

# V. PCR-Inverse

La PCR inverse a pour but d'amplifier une région d'ADN inconnue adjacente à une région connue (Figure 19) (Ochman *et al.*, 1988; Triglia *et al.*, 1988; Silver et Keerikatte, 1989).

### Ligature

L'ADN génomique digéré par l'enzyme de restriction est circularisé de façon à favoriser la formation de molécules circulaires monomériques. Cette ligature se fait selon les conditions décrites par Dugaiczyk *et al*. (1975) et Collins et Weissman (1984).

Il faut tout d'abord calculer "*j*" qui est la concentration locale d'une extrémité proche d'une autre extrémité de la même molécule.

$$j = \frac{63,4}{\left[Taille(kb)\right]^{V_2}} \mu g/mL$$

Puis on calcule "*i*" qui est la concentration totale en ADN. En prenant 10i < j, on favorise à 90% la formation de cercle monomérique.

La ligation est réalisée pendant 12 heures à 14°C (Sambrook *et al.*, 1989) avec la T4 DNA Ligase (New England Biolabs).

Mélange réactionnel		<u>Tampon x 10</u>
ADN génomique digéré	lμg	500 mM TrisHCl pH 7,8
T4 DNA Ligase	1 μL (400 unités)	100 mM MgCl <sub>2</sub>
Tampon x 10	40 μL	100 mM dithiothréitol
H <sub>2</sub> O	QSP 400 μL	10 mM ATP
		250 μg / mL SAB

Après traitement au phénol, l'ADN est précipité dans 0,3 M acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol 98%. Le culot est repris dans un volume final de 10  $\mu$ L d'eau stérile et utilisé pour l'amplification par PCR.

## Amplification

On réalise l'amplification par PCR avec la Taq DNA Polymérase (Appligène) extraite de *Thermophillus aquaticus*, en présence des oligonucléotides et d'un mélange contenant les quatre nucléotides triphosphate (dNTP). L'ADN polymérase réalise l'amplification dans le sens 5' vers 3'.

Mélange réactionne	1	Tampon x 10
ADN ligaturé :	10 μL	100 mM KCl
Tampon x 10 :	5 μL	100 mM (NH4) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
oligonucléotide 1 :	400 ng	200 mM TrisHCl pH 8,8
oligonucléotide 2 :	400 ng	20 mM MgSO <sub>4</sub>
dNTP :	400 μΜ	1 % Triton X-100
Taq polymérase :	2 unités	
H <sub>2</sub> O :	QSP 50 µL	

On ajoute 100  $\mu$ L d'huile de vaseline sur le mélange afin d'éviter l'évaporation des composants et d'éventuelles contaminations. On travaille sous une hotte à flux laminaire et avec des produits stériles afin d'éviter au maximum les contaminations.
### Matériel et méthodes

Lors d'une amplification par PCR, un cycle classique est généralement constitué de trois phases. La première est la phase de dénaturation de l'ADN (1 minute à 95°C). La seconde est la phase d'hybridation des oligonucléotides sur la cible. La température est ici fonction des oligonucléotides choisis, mais de manière générale, elle oscille entre 52 et 60°C. Et enfin, la dernière est la phase d'élongation. La température lors de cette phase dépend de la température où l'enzyme réalise la polymérisation de l'ADN à partir des amorces; pour la Taq polymérase cette température est de 70°C. Lors de l'amplification on effectue plusieurs cycles. Le nombre de cycles est fonction de la durée de vie de l'enzyme (pour la Taq polymérase, elle est de 2 heures à 95°C). Pour l'amplification à réaliser, nous avons choisi 30 cycles de PCR. A la fin du dernier cycle nous avons ajouté un temps d'élongation plus long, afin de favoriser la synthèse d'une déoxyadénosine 3' sortante sur le produit PCR (figure 20).



Figure 20: Cycles d'amplification utilisés lors de la PCR-I.



*Figure 21 Représentation schématique du clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide.* 



Figure 22: Carte de restriction du plasmide  $pCR^{TM}II$  utilisé pour le clonage des fragments issus de la PCR Inverse.

### VI. Clonage

### Principe

Le clonage consiste à intégrer un fragment d'ADN dans un plasmide (figure 21).

Le clonage des fragments d'ADN amplifiés par PCR est réalisé avec le kit « TA Cloning System » d'Invitrogen. En effet, lorsqu'on effectue une amplification par PCR à l'aide de la Taq DNA polymérase, le produit synthétisé porte à son extrémité 3' une déoxyadénosine sortante. Le plasmide fourni par le kit (pCR<sup>TM</sup> II; 3,9 kb; figure 21) contient à son extrémité 3' une déoxythymidine sortante. Le clonage est donc facilité par l'appariement A=T.

### Ligature

Après purification du produit PCR par électrophorèse en agarose à faible point de fusion, on effectue la ligature avec le vecteur pCR<sup>TM</sup> II (TA Cloning<sup>TM</sup> System, Version 1.3, Invitrogen, figure 22). Pour cette ligature, selon les indications fournies par le kit, on respecte le taux molaire de 1 : 3 entre le vecteur et l'insert. La réaction de ligature s'effectue à  $12^{\circ}$ C pendant une nuit.

Mélange réactionnel
6 μL d'eau stérile
1 μL de tampon x 10
2 μL de vecteur pCR II à 25 ng/μL
1 μL de produit PCR
1 μL T4 DNA ligase (1U/μL)

Tampon x 10 60 mM TrisHCl, pH 7,5 60 mM MgCl<sub>2</sub> 50 mM NaCl 1 mg/mL SAB 70 mM β-mercaptoéthanol 1 mM ATP 20 mM DTT 10 mM spermidine

En vue de l'étude du promoteur du gène de la nitrate réductase (p*nia*), on réalise des constructions avec des gènes rapporteurs (figure 23).

Pour transformer les explants cotylédonaires et foliaires de *C. intybus*, ainsi que la suspension cellulaire, on utilise une construction *pnia*:UidA. Le vecteur utilisé sera pBI101 qui contient les gènes *UidA* et *nptII*. Le fragment *Hin*dIII / *Bam*HI du promoteur *nia* cloné sera isolé et traité avec l'enzyme Klenow. Le vecteur est digéré par *Sma*I afin



*Figure 23:* Représentation schématique du vecteur pBI 101, utilisé pour le clonage du promoteur de la nitrate réductase afin de transformer les explants et la suspension cellulaire de Cichorium intybus L.

d'obtenir une coupure franche. Le clonage est ensuite réalisé dans les conditions décrites précédemment.

### Transformation des bactéries par électroporation

\* Préparation de cellules compétentes à l'électroporation selon la technique de BioRad Laboratories. La souche bactérienne d'*Escherichia coli* utilisée pour la transformation est DH5α. On inocule 30mL de LB avec une colonie fraîche ayant poussé la nuit et on laisse se développer cette pré-culture pendant une nuit. On inocule ensuite un litre de milieu LB avec 10 mL de cette pré-culture. On laisse pousser les cellules à 37°C sous forte agitation jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> nm de 0,5 à 0,8 (les meilleurs résultats sont obtenus avec des cellules ayant poussé rapidement). Puis on réalise deux lavages par centrifugations dans un rotor réfrigéré (15 minutes à 4000g) en re-suspendant le culot bactérien dans 1 litre, puis 0,5 litre d'eau froide stérile. Le culot est ensuite resuspendu dans 20 mL de glycérol 10% froid puis, après centrifugation, dans 2 mL de glycérol 10%. La concentration bactérienne est alors de 3.10<sup>10</sup> cellules/mL environ. Cette suspension bactérienne est aliquotée en microtubes (aliquotes de 40 μL), congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C.

Transformation par electroporation. Elle est réalisée avec l'électroporateur « Gene Pulser<sup>®</sup> » (Bio Rad), réglé sous une capacitance de 25  $\mu$ F, un voltage de 2,5 kV et une résistance de 200 ohms. On met en contact, 1 minute sur de la glace, l'ADN ligaturé et les cellules compétentes. On transfère ensuite cette suspension dans une cuvette d'électroporation froide sur laquelle on applique un champ électrique de 12500 V pendant 4,5 à 5 millisecondes. On ajoute immédiatement 1 mL de milieu SOC pour resuspendre les bactéries 1 heure à 37°C. Cette suspension est ensuite étalée sur milieu LB supplémenté d'antibiotique afin de permettre la sélection des recombinants.

### Transformation par choc thermique.

On peut également réaliser la transformation par choc thermique en suivant le protocole fourni par Invitrogen, s'inspirant de la méthode décrite par Hanahan (1985). Cette technique utilise les bactéries INV $\alpha$ F' (également fournies par le kit « TA Cloning »), compétentes à la transformation. On ajoute à 50 µL de ces bactéries, 2 µL de β-mercaptoéthanol 0,5 M, puis 2 µL du mélange de ligation. On laisse ce mélange sur glace pendant une demi-heure. On effectue le choc thermique pendant exactement 30

	LB	SOB -	SOB +	SOC
Bactotryptone	10 g	20 g	20 g	20 g
Extrait autolytique de levure	5 g	5 g	5 g	5 g
NaCl	10 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
KCl			2,5 mM	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>		•	10 mM	10 mM
Glucose		•		20 mM
$H_2O$	qsp 1 L	qsp 1 L	qsp 1 L	qsp 1 L
pH	7,5	7	7	7

Tableau 4:Composition des milieux de culture bactérienne LB, SOB -, SOB + et SOC. Les<br/>milieux solides contiennent 15 g d'agar.

secondes à 42°C puis 2 minutes sur la glace. On ajoute ensuite 450  $\mu$ L de milieu SOC, avant de mettre en incubation pendant une heure à 37°C sous forte agitation. On étale enfin 50 et 200  $\mu$ L de cette suspension sur milieu LB solide supplémenté d'ampicilline et de X-Gal (l'IPTG n'est pas nécessaire).

### Sélection des recombinants

Les bactéries transformées sont étalées sur milieu LB supplémenté de kanamycine et d'ampicilline, résistances conférées par les plasmides pCR<sup>™</sup> II et pBI121 respectivement.

Pour la sélection directe des recombinants, la méthode de sélection par  $\alpha$ complémentation (ou sélection de colonies blanches ou bleues) a été utilisée. L'opéron lactose est un système d'expression de trois gènes (lac Z, lac Y et lac A) qui codent pour trois enzymes (ß-galactosidase, perméase et transacétylase) qui participent au métabolisme du lactose de la bactérie. Le système de régulation comprend un opérateur et un promoteur qui contrôlent la transcription des trois gènes. En absence de lactose, la synthèse des trois enzymes est réprimée par une protéine tétramérique, produit du gène lac I.

La fixation du lactose ou d'un autre ß-galactoside comme l'isopropyl-ß-D-galactoside (IPTG) sur le répresseur déréprime le promoteur et permet la transcription des trois gènes. La présence d'activité ß-galactosidasique dans les clones bactériens peut être visualisée par addition d'un chromogène comme le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside (X-gal). L'hydrolyse de ce substrat par la ß-galactosidase libère un composé qui colore la colonie en bleu.

Les souches d'*Escherichia coli* portant une délétion du gène lacZ sont dépourvues d'activité  $\beta$ -galactosidase (le peptide  $\omega$  codé par ce gène est dépourvu des acides aminés 11 à 41). Des expériences de conjugaison ont montré qu'il est possible de restaurer l'activité  $\beta$ -galactosidasique par complémentation avec un autre peptide qui apporte la région manquante. Ce peptide ( $\alpha$ ) est composé des 146 premiers acides aminés de la  $\beta$ -galactodisase.

On utilisera donc un plasmide porteur du gène lacZ' (codant pour le peptide  $\alpha$ ) au niveau du site multiple de clonage. L'insertion d'un fragment d'ADN dans l'un des sites de clonage provoque l'interruption de la phase de lecture du peptide  $\alpha$  et l' $\alpha$ -complémentation ne peut plus avoir lieu. Les colonies recombinantes seront donc blanches en présence de X-gal et d'IPTG.

Solution	Quantité
Tris base	108 g
Acide bor	aue 55 g
Na.EDTA	6.4 g
H,Ô	qsp 1 L

Composition du tampon TBE x 10.

Solution		Quantité	
Acrylamide Bis-acrylami H,O	de	380 g 20 g qsp 1 L	

Composition de la solution de polyacrylamide 40%.

Solution	Quantité
Urée	0,1 M
TBE	1 x
Polyacrylamide	6 %
APS	2,25.10 <sup>3</sup> M
TEMED	0,1 M

Composition d'un gel de polyacrylamide à 6%.

Tableau 7:Composition des solutions de TBE, de polyacrylamide 40% et composition<br/>d'un gel de séquençage à 6%.

### VII. Séquençage

Le séquençage se fait selon la méthode de Sanger (Sanger, 1981) à l'aide du kit « Sequenase, version 2.0 » (United States Biochemical). On utilise deux oligonucléotides appelés « reverse » et « forward » capables de s'hybrider sur le vecteur de part et d'autre de l'insert. On peut ainsi séquencer à partir des extrémités droite et gauche de l'insert.

Après dénaturation en présence de NaOH 2N et d'EDTA 2mM (30 minutes à 37°C), l'amorce est hybridée avec la matrice en effectuant une renaturation lente d'environ 30 minutes (jusqu'à 35°C) après chauffage du mélange à 65°C. Puis le couple matrice / amorce est incubé avec un mélange contenant l'enzyme (Sequenase), un déoxynucléotide marqué ([ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP) ainsi que les trois autres déoxynucléotides non marqués, en absence des didéoxynucléotides. Cette étape se déroule à température ambiante pendant 5 minutes. Enfin, le mélange précédant est réparti en quatre tubes dans lesquels ont été préparés les mélanges de didéoxynucléotides triphosphate adéquats (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP). Ces réactions d'élongation se déroulent à 37°C pendant 5 minutes en absence de nucléotides marqués libres. Les réactions de polymérisation sont stoppées par 4 µL d'une solution d'arrêt. Avant d'être chargé sur le gel d'électrophorèse, l'ADN est dénaturé à 75°C pendant 2 minutes puis refroidi dans la glace.

Les fragments d'ADN sont soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide à 6 % (tableau 7). Deux migrations (4 et 6 heures à 1400 V, 80 mA, 80 W et 55°C) sont effectuées sur chaque échantillon dans un tampon 1 x TBE. Après séchage (80 °C pendant 1 heure), le gel est déposé sur film autoradiographique pendant 24 à 48 heures.

Les séquences sont analysées et les alignements sont effectués sur PC/Gene<sup>®</sup> et sur Fasta@ embl.heidelberg.de.

### VIII. Extraction des protéines nucléaires

Les extraits végétaux sont hachés dans un tampon d'homogénéisation à 4°C. Après filtration (sur miracloth 1000  $\mu$ m puis nylon 80  $\mu$ m), on ajoute 0,5 % de Triton X-100 à la suspension. Les noyaux, précipités à 3000 g, sont repris dans le tampon d'homogénéisation, puis purifiés sur un gradient de Percoll (30-60 %). Après centrifugation à 200 g les noyaux qui sédimentent à l'interphase 30-60, sont lavés dans une solution de 0% Percoll afin d'éliminer toute trace de Percoll et de Triton. On utilise une centrifugation sur coussin de saccharose à 85% afin de purifier encore une fois les noyaux avant d'effectuer leur lyse (tableau 8). On ajoute à ce lysat 1/10 de volume de

Solution	Concentration
PIPES KOH pH 7,0	10 mM
Hyxelene glycol	1 M
MgCl,	10 mM
β-mercapto-éthanol	5 mM

Composition du tampon d'homogénéisation, pour l'extraction des protéines nucléaires.

Jonanon	en perce	NEB
PIPES KOH pH 7,0 Hyxelene glycol MgCl2 β-mercapto-éthanol		10 mM 500 mM 10 mM 5 mM

Composition du tampon de dilution du percoll, pour l'extraction des protéines nucléaires.

Solution	and the second secon	Concentration
HEPES KOH pH	7,6	15 mM
KCl		110 mM
MgCl <sub>2</sub>		5 mM
		1 mM
Antipain		5 μg.mL
Leupepiin		<u> </u>

Composition du tampon de lyse, pour l'extraction des protéines nucléaires.

Solution	NEB	NEB II
HEPES / KOH pH 7,6	25 mM	25 mM
KCl	40 mM	40 mM
DTT	1 mM	•
EDTA	0,1 mM	0,1 mM
Antipain	5 μg/mL	•
Leupeptin	5 µg/mL	-
Glycerol	10 %	10 %
ß-mercapto-éthanol		5 mM

Composition des tampon NEB et NEB II, pour l'extraction des protéines nucléaires.

Tableau 8:Composition des tampons d'homogénéisation, de dilution du percoll, de lyse,<br/>NEB et NEB II pour l'extraction des protéines nucléaires.

### Matériel et méthodes

 $(NH_4)_2SO_4$  pendant 30 minutes à 4°C. Cette précipitation permet d'éliminer les protéines de faible masse moléculaire par une ultra-centrifugation à 40000 rpm (Rotor Ti70, Beckman) pendant 60 minutes à 4°C. On réalise ensuite une seconde précipitation des protéines de faible masse moléculaire au  $(NH_4)_2SO_4$  0,3 g/mL. Une centrifugation de 15 minutes à 10000 g (4°C) est alors réalisée pour obtenir le culot protéique qui sera resuspendu dans un minimum de tampon NEB, puis dialysé contre un tampon NEB II une nuit à 4°C. Une dernière centrifugation à 12 000 g est réalisée à 4°C pendant 10 minutes afin d'éliminer d'éventuels déchets. Les extraits nucléaires sont alors prêts à être utilisés de suite ou congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. La quantité de protéines est dosée selon Bradford (1976).

### IX. Retards sur gel

### La technique de retards sur gel est résumée dans la figure 24

### Préparation de la sonde

Après avoir été isolés sur agarose à faible point de fusion, les fragments d'ADN à étudier sont marqués avec de l' $\alpha^{32}$ P-dCTP par l'intermédiaire de l'enzyme Klenow polymérase I (Biolabs). La réaction de marquage est réalisée à température ambiante pendant 15 minutes dans les conditions suivantes:

Mélange réactionnel	
ADN	100 ng
$\alpha^{32}$ P-dCTP	2 μL
dA, dG, dT 2,5 mM	1 μL
Klenow	1 μL (1 U)
H <sub>2</sub> O	qsp 20 µL

Dès la fin de la réaction, le mélange est déposé sur gel d'agarose à 1,5%. Après une heure de migration à 100 V, les fragments d'ADN marqués sont récupérés et purifiés.

### Réaction d'hybridation ADN-protéines

Le fragment d'ADN purifié marqué, est resuspendu dans un volume de 100  $\mu$ L de TE. Quand on réalise pour la première fois une réaction d'hybridation (tableau 9) entre les protéines et l'ADN, trois paramètres importants doivent être ajustés: les concentrations de dIdC, de la sonde d'ADN et des protéines nucléaires. En premier lieu il faut faire varier

Solution		Concentration
KCl		45 mM
HEPES /	КОН рН 7,6	25 mM
EDIA DTT		1,1  mM
Glycérol		5 %

Tableau 9:Composition du tampon d'attachement lors de la réaction d'hybridation<br/>protéines-ADN lors de la réalisation des retards sur gel.



Figure 24: Représentation schématique des expériences de retard sur gel. Sur un gel d'agarose 1,3%, les différentes réactions sont déposées. Après une migration dans du TAE pendant 4 à 5 heures à 150 V, on peut remarquer des différences dans les vitesses de migration. L'ADN seul migrera plus vite que l'ADN retardé par des protéines.

### Matériel et méthodes

la quantité de protéines. Quand la concentration idéale est trouvée, il faut faire varier les quantités de dIdC et de sonde pour avoir la meilleure réaction possible.

La réaction d'hybridation avec les protéines nucléaires est alors réalisée dans les conditions suivantes:

2 μL	
1 μL	0,05 à 0,1 pmole
0,5 à 1 μL	2 à 6 µg
2,5 μL	
qsp 10 μL	
	2 μL 1 μL 0,5 à 1 μL 2,5 μL qsp 10 μL

La réaction s'effectue à température ambiante pendant 15 à 20 minutes, puis les échantillons sont immédiatement déposés sur gel d'agarose à 1,5 % dans une solution de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM. Une migration de 3 à 4 heures à 150 V est effectuée. Pendant la migration, la circularisation du tampon doit être effectuée afin d'éviter les changements de pH dûs à une augmentation de température. A la fin de la migration, le gel est déposé sur un vieux film autoradiographique afin d'être séché une nuit à 65°C. Le gel est alors exposé à -80°C contre un film autoradiographique pendant 1 à 3 jours selon l'intensité du marquage.

### X. Gels protéiques

### Gels bi-dimensionnels

#### Principe

La réalisation des gels en deux dimensions (gels 2D), est réalisée en deux étapes. La première, appelée IEF (<u>i</u>so<u>e</u>lectro<u>f</u>ocalisation), est suivie d'une seconde étape qui consiste en une migration des protéines selon la masse moléculaire dans un gel de polyacrylamide (figure 25).

Préparation des gels d'isolelectrofocalisation

Pour 20 tubes, on réalise les gels de la façon suivante :

 $H_2O$  6 mL Acrylamide 30 % 2,5 mL



*Figure 25:* Représentation schématique de la migration en 2D des protéines en gel de polyacrylamide. Les protéines sont d'abord séparées selon le point isoélectrique (IEF) puis selon leur masse moléculaire, les plus petites migrant plus vite. Ampholines (3/10) 1 mL

On dégaze pendant une minute puis on ajoute :

Triton 10%	2 mL
APS 10%	40 µL
TEMED	20 µL

On coule le gel dans le fond d'une éprouvette de 100 mL. On place ensuite les tubes marqués à 13 mL avant de couler lentement de l'eau le long de la paroi de l'éprouvette jusqu'à la hauteur de 13 mL. On laisse ensuite polymériser pendant une à deux heures.

Préparation des solutions pour les électrodes

- Cathode:
   préparer 500 mL de NaOH 20 mM
   dégazer cette solution
- Anode:
   préparer 3 L d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM

### Migration

On place les tubes sur le portoir en les entourant de parafilm sur le haut. Dans le bas des tubes, on remplit la cuve avec la solution de  $H_3PO_4$  10 mM. On remplit celle du haut avec la solution de soude. On réalise ensuite une pré-isofocalisation d'une heure à 1200 V, 300 mA et 3 W.

Après cette pré-migration, on dépose en haut des tubes, grâce à une seringue Hamilton, les échantillons en évitant les bulles d'air. On ajoute de nouveau de la soude jusqu'à ras-bord des tubes en évitant les bulles d'air. La migration est ensuite réalisée pendant 17 heures à 1200 V, 300 mA et 3 W puis 30 minutes à 1500 V, 300 mA et 3 W.

Après la migration, les gels sont démoulés par pression à l'aide d'une seringue remplie d'eau. Ils sont alors stockés à  $-70^{\circ}$ C dans 500 µL de tampon d'équilibration (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 2,3%) additionné de 50 µL de bleu de bromophénol.

Solution	Quantité
Tris Glycine SDS H.O	6 g 28,8 g 1 g qsp 1L

Composition de la solution de migration pour les gels SDS-PAGE.

Solutio	n		Quantité
Sodiun H,O	r thiosulj	fate	40 mg qsp 250 mL

Composition de la solution de pré-traitement pour les gels SDS-PAGE.

Solution	$i \rightarrow i$	- 444	4	Quan	tité
AgNO, Formald H,O	léhyde 3	5%		200 m 150 µ qsp 2:	ng L 50 mL

Composition de la solution d'imprégnation pour les gels SDS-PAGE.

Solution		Quantité
Sodium thiosul	fate	0,8 mg
Carbonate de se	odium	12 g
Formalaenyae . H,O	33%	qsp 250 mL

Composition de la solution de révélation pour les gels SDS-PAGE.

Solution			Que	intité
Acide ac Ethanol H <sub>2</sub> O bidi	étique istillée		12 9 50 9 qsp	% % 2 L

Composition du fixateur pour les gels SDS-PAGE.

Tableau 10:Composition des solutions de migration, de pré-traitement, d'imprégnation, de<br/>révélation et de fixation pour les gels SDS-PAGE.

### Matériel et méthodes

### Deuxième dimension: SDS page

Pour la deuxième dimension, on réalise un gel de séparation à 15% dans les conditions suivantes:

Tris HCl 1,5 M pH 8,8	3,84 mL
SDS 10 %	0,25 mL
Acryl 30 %	12,8 mL
APS 10 %	128 µL
TEMED	12,8 µL
H <sub>2</sub> O	8,6 mL

On dépose le boudin décongelé entre les deux plaques après avoir éliminé le tampon d'équilibration. Les plaques sont déposées dans la cuve contenant le tampon de migration (tableau 10). La migration est réalisée à 250 V pendant 2h30.

### Coloration - Révélation

Une fois la migration réalisée, les gels sont démoulés puis traités de la façon suivante afin de colorer puis révéler les protéines présentes (composition des solutions : tableau 10):

- A 1 minute dans 200 mL de solution de pré traitement
- ♦ 20 minutes dans 200 mL de solution d'imprégnation

- l'apparition des premiers spots puis éliminer la solution et verser de nouveau
- 150 mL de solution de révélation pour terminer cette révélation
- ♦ 1 rinçage rapide dans H<sub>2</sub>O bidistillée
- ♦ Conservation des gels dans le fixateur à 4°C.

Les gels sont ensuite numérisés puis analysés sur une station SUN à l'aide du logiciel POLARIS.



Figure 26: Représentation schématique de la spectrométrie de masse MALDITOF-MS. Les peptides, fixés sur une matrice (1), sont irradiés par un rayonnement UV (2). Les peptides ionisés sont ensuite placés dans un champ électrique (3) et accélérés dans une chambre vide (4). Le temps de vol d'un peptide sera proportionnel à sa masse. Un détecteur est placé au bout de la chambre (5).On obtient ainsi le spectre de masse des peptides composant la protéine (6).

### Mini-gels monodimensionnels

On réalise un mini-gel polyacrylamide 12% composé d'un gel de séparation et d'un gel de concentration. Le gel de séparation est réalisé dans les conditions suivantes: 0,375 M Tris HCl pH 8,8; 12% acrymalamide-bis acrylamide; 0,1% SDS; 0,05% APS et  $5.10^{4}\%$  TEMED. On coule ensuite un gel de concentration, composé de 4% acrymalamide-bis acrylamide; 0,125 M Tris Hcl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,05% APS et 1.10<sup>-3</sup>% TEMED.

Après 45 minutes de migration des protéines à 200 Volts, le gel est démoulé et traité de la même façon que les gels 2D en ce qui concerne la coloration et la révélation.

### XI. Spectrométrie de masse

## La technique de spectrométrie de masse MALDIOF est résumée dans la figure 26.

L'identification des protéines a été réalisée selon la technique décrite par Henzel et al. (1993) et Shevchenko et al. (1996) avec certaines modifications. Les protéines révélées au nitrate d'argent sont extraites du gel par découpage du spot et lavées trois fois 20 minutes sous agitation dans 400 µL d'une solution d'ammonium carbonate/acétonitrile (ACN) 125 mM. La solution de lavage est alors supprimée et les fragments de gel sont séchés à température ambiante pendant 2 heures. La digestion enzymatique est initiée en incubant les fragments de gel dans une solution de carbonate d'ammonium 125 mM. On ajoute ensuite de l'acide acétique à 50 mM et finalement la digestion est réalisée par un ajout de 50 mM d'acide acétique contenant 7 à 7,5 unités de trypsine (Promega). Après l'adsorption de la solution de protéase, des aliquotes de 5 µL d'eau bi-distillée sont ajoutées séquentiellement. Les fragments de gel sont alors placés dans des tubes Eppendorf<sup>®</sup> avec un volume d'eau minimum pour les immerger totalement. La digestion est effectuée pendant 12 à 16 heures à 37°C. La phase liquide est ensuite prélevée, et les peptides sont récupérés après deux extractions avec des solutions de 45% acétonitrile et 10% acide formique. Pour récupérer les peptides très hydrophobes, une troisième extraction avec 95% d'acétonitrile et 5% d'acide formique est réalisée. Les extraits sont finalement séchés au Speed Vac-concentrator (Savant).

Les analyses MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time of Flight) sur les produits digérés par trypsine sont réalisées sur un réflecteur Vision 2000 (Finnigan, Bremen) en mode ion positif et avec un voltage accélérant de 6kV. Les peptides sont suspendus dans une solution de  $CH_3CN/H_20$  (1 :1) contenant 0,5% d'acide formique



Figure 27: Représentation schématique du test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en double sandwich. Le test est réalisé dans un puits de plaque ELISA (1) L'anticorps spécifique est déposé dans les cupules (2) de la plaque de microtitration. Il est ainsi adsorbé sur les parois, sensibilisant la plaque. La suspension protéique est alors ajoutée (3). Si une protéine est reconnue par l'anticorps, elle est retenue lorsque la cupule est lavée pour enlever les protéines non fixées. Un anticorps secondaire est ajouté (4) puis le conjugué anti-phosphatase alcaline (5). On ajoute alors un substrat (6) que l'enzyme va dégrader en un produit coloré qui sera dosé par mesure spectrophotométrique.

dans laquelle 0,5  $\mu$ L ont été mélangés directement sur la cible avec la matrice composée de 1  $\mu$ L d'acide 2-5 dihydoxy-benzoïque (10 mg/mL dans CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>0 (7 :3)). Entre 30 et 50 coups de laser sont accumulés pour obtenir le spectre final.

## XII. Quantification de la nitrate réductase par la technique d'ELISA

### Extraction non dénaturante de protéines

Pour extraire les protéines, on broie dans l'azote liquide 2 g de matériel végétal frais. On ajoute 5 % (P/P) de PVP insoluble puis 8 mL par gramme de matière fraîche de tampon d'extraction. Après une centrifugation de 20 minutes à 4°C et 10000 g, on filtre le surnageant sur du Miracloth®. La nitrate réductase ayant une masse moléculaire de plus de 200 kDa, on précipite les protéines avec 45 % de  $(NH4)_2SO_4$  que l'on ajoute progressivement sous agitation à 4°C. On incube pendant une heure à 4°C afin de précipiter les protéines. Après une centrifugation de 30 minutes à 4°C et 130000 g, le culot protéique est resuspendu dans 200 µL de tampon d'extraction. Les protéines ainsi extraites peuvent être conservées plusieurs mois à -80°C.

### Test ELISA en sandwich (figure27)

Après avoir lavé les plaques ELISA deux fois à l'eau distillée, on dépose 100 µL de la solution d'anticorps monoclonal anti-NR de tabac (C. Meyer, INRA Versailles) diluée au 1/1000 dans du tampon carbonate 0,1 M (tableau 11). On ne dépose jamais d'anticorps dans la couronne de la plaque, c'est à dire les puits situés à l'extérieur. Dans ces derniers on ne dépose en effet que de l'eau afin d'hydrater la plaque. On incube la plaque à 4°C pendant une nuit. On lave ensuite la plaque 3 fois avec le tampon ELISA (tableau 11). Lors de ces lavages, il faut veiller à éliminer correctement toute trace de tampon.

Avant de déposer les extraits protéiques, on effectue une série de dilutions de ces extraits dans le tampon ELISA supplémenté de 5 % de SAB. On dépose ensuite 100  $\mu$ L de ces extraits dans chaque puits. Après une incubation de 1h30 à 37°C, on lave la plaque 3 fois avec le tampon ELISA. On dépose ensuite l'anticorps polyclonal de lapin anti-NR d'épinard dilué au 1/1000 dans le tampon ELISA + 5 % SAB qu'on laisse incuber 1h30 à 37°C. La plaque est de nouveau lavée 3 fois avec le tampon ELISA. On dépose enfin l'anticorps anti-lapin conjugué à une phosphatase alcaline (Sigma) dilué au 1/1000 dans le

61

	Solution	Concentration
HEPE.	S KOH pH 8,2	50 mM
EDTA		1 mM
NaCl		100 mM
Cystéin	1e	5 mM
Leupep	otine	1 μ <b>M</b>
FAD		5 μM
Molyba	date de sodium	1 μM

Composition du tampon d'extraction protéique en vue du test ELISA.

and a state	Solution	Quantité
Azide 10	%	20 mL
Tween 2	5%	20 mL
NaCl		80 g
РОДИК,	1M	83,/ mL
РО,Н,К	11/11 (1997) 	10,3 mL

Composition du tampon ELISA pour le test ELISA sur la protéine NR.

	Solution	Juantité
Na,CO	D, 0,1M	33 mL
NaHO	EO, 0,1M	67 mL

Composition du tampon carbonate pour le test ELISA sur la protéine NR.

Soluti	on	Quantité
Diéthanolamine	10% pH 9,8	20 mL
MgCl2 HCl PNPP		1 mM 18 mL 200 mg

Composition du tampon phosphatase alcaline pour le test ELISA sur la protéine NR.

Tableau 11: Composition des tampons d'extraction protéique, ELISA, carbonate et phosphatase alcaline pour le test ELISA sur la protéine NR.

tampon ELISA + 5 % SAB qu'on laisse de nouveau incuber 1h30 à 37°C. On lave 3 fois avec le tampon ELISA. On dépose alors 100  $\mu$ L de tampon phosphatase alcaline afin de démarrer la réaction. On effectue immédiatement une lecture de DO à 406 nm. Quand on estime que la DO atteint son maximum (±1), on arrête la réaction avec 100  $\mu$ L de NaOH 3N. On effectue alors la dernière mesure de DO.

### Calcul des quantités relatives de protéine

La lecture des DO est effectuée à 406 nm jusqu'à un maximum de 1. On réalise alors un graphique selon l'équation suivante:

$$DO=f\left(\log^{facteurdedilution}
ight)$$

On obtient alors des courbes sigmoïdes approximativement parallèles. Dans la partie linaire commune à toutes les courbes, on choisit une DO médiane, on en déduit les dilutions donnant la même DO pour tous les échantillons. On a alors une concentration de référence connue,  $c_i$ . Il faut alors rapporter la quantité de protéine par rapport à la quantité totale de protéines de l'extrait (dosée par Bio-Rad<sup>®</sup>). On obtient alors les quantités relatives de protéine NR selon chaque condition.

### XII. Transformation par Agrobacterium tumefaciens

### I. Transformation de la suspension cellulaire de Cichorium intybus Transformation

La suspension cellulaire de *Cichorium intybus* âgée de cinq jours est utilisée pour effectuer la transformation alors qu'elle est en phase active de croissance. Les cellules sont centrifugées à 200g pendant 10 minutes afin d'éliminer le milieu de culture; elles sont ensuite placées dans un milieu neuf. Les agrobactéries en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 5000g pendant 10 minutes. Le culot de bactéries est ensuite resuspendu dans du MgSO<sub>4</sub> 10 mM afin d'atteindre une concentration de 4.10<sup>8</sup> bactéries par mL.

Dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits, 200  $\mu$ L de la suspension cellulaire sont placés avec 20  $\mu$ L de la suspension bactérienne. Les microplaques sont ensuite incubées 24 heures à 20°C dans une enceinte stérile avec une photopériode de 16 heures de lumière (1500 W/m<sup>2</sup>) et 8 heures d'obscurité.

	Solution	Concentration
NaH,PC EDTA p Triton X β-merca MUG	D₄pH 7 H 8 (-100 pto-éthanol	50 mM 1 mM 0,1 % 10 mM 0,5 mM

Tableau 12:Composition du tampon de révélation MUG utilisé pour la détection de<br/>l'activité  $\beta$ -glucuronidase en microplaques.

### Mise en évidence des cellules transformées

 $200 \ \mu$ L de tampon de réaction MUG (tableau 12) est ajouté aux cellules cultivées 24 heures en présence des agrobactéries. On incube le tout une heure à 37°C. L'activité GUS des cellules transformées est visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus BH2 (longueur d'onde d'excitation: 334 et 365 nm; filtre barrière: 420 nm).

L'activité  $\beta$ -glucuronidase est également mesurée selon Jefferson *et al.* (1987).

### Analyse du taux de transformation

 $200 \ \mu$ L de tampon de réaction MUG sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque. Après une incubation de 2 heures à 37°C, la mesure de fluorescence de chaque puits est réalisée à l'aide d'un lecteur de type Fluoroscan II. La fluorescence de chaque puits est alors comparée à celle de puits témoins contenant soit des agrobactéries, soit des cellules végétales. La comparaison des différentes expériences est réalisée après division des valeurs de fluorescence par la fluorescence des puits ne contenant que les cellules végétales. On peut ainsi homogénéiser les résultats.

Afin de parfaire l'analyse, les valeurs de la courbe de distribution sont traitées de façon à obtenir une courbe de distribution centrée réduite:

$$z_i = \frac{x_i - \overline{x}_i}{\sigma_i}$$

où  $x_i$  est la fluorescence relative d'un puits

- $\overline{x}_i$  la moyenne des fluorescences relatives des cellules de chicorée seules
- $\sigma_i$  l'écart type des fluorescences relatives des cellules de chicorée seules

Les courbes de réparation, le calcul du  $\chi^2$ , de la loi normale, le changement de coordonnées et l'estimation du taux de transformation ont été réalisés grâce à une feuille de calcul, développée au laboratoire, sur le logiciel Microsoft Excel IV de la société Microsoft Corporation.

### II. Transformation des explants de Cichorium intybus

La transformation de *Cichorium intybus* est réalisée soit à partir de cotylédons étiolés, soit à partir de feuilles (Abid *et al.*, 1995). Dans les deux cas, l'explant est légèrement lacéré puis co-cultivé pendant 48 heures sur un milieu contenant 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP et 100  $\mu$ M d'acétosyringone avec la suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* 

63

Macroéléments	Concentration en mg.l-1
CaCl, 2H,O	75
MgSO <sub>a</sub> 7H,O	250
NaH,PO, H,O	125
NaNO,	600
KCl	750
Fer-EDTA	
FeSO, 7H,O	19,5
Na,-EDTA	1
Microéléments	and the second secon
ZnSO, 7H,O	1
MnSO <sub>2</sub> 4H,O	0,1
CuSO, 5H,O	0,03
AlCl,	0,03
NiCl., 6H,0	0,03
KI	0,01
Saccharose	
	10.10 <sup>3</sup> pour milieu H10
	20.10 <sup>3</sup> pour milieu H20
Agar	5.103
pH 5,	6

Tableau 13:Composition des milieux de Heller pour l'enracinement des bourgeons (H10)<br/>et pour la germination des graines (H20).

Macroéléments de Heller	Concentration en mg.l'
CaCl, H,O	440
MgSO, 7H,O	185
<i>КН,РО</i> ,	85
KNO,	1900
NH NO,	1650
Fer-EDTA	
FeSO, 7H,O	19,5
Na,-EDTA	1
Microéléments de Heller	
ZnSO, 7H,0	$\mathbf{t}$
MnSO <sub>2</sub> 4H,O	0,1
CuSO, 5H,0	0,03
AICI,	0,03
NiCl <sub>"</sub> 6H,O	0,03
KI	0,01
Vitamines de	and the state of the second
Morel et Wetmore	
Pantothénate de Calcium	$\sim$ $\sim$ $1$
Thiamine	1
Acide nicotinique	$\mathbf{I}$
Pyridoxine	1
Biotine	1
Inositol	100
Saccharose	10.10 <sup>3</sup>
Glutamine	150
Agar	5.10 <sup>3</sup>

Tableau 14:Milieu de culture utilisé pour l'induction et le bourgeonnement des explants<br/>cotylédonaires et foliaires.

contenant un ADN-T possédant le gène d'intérêt à étudier. Les explants sont ensuite rincés dans une solution de céfotaxime 250 mg.L<sup>-1</sup> avant d'être déposés sur le milieu de sélection. Ce dernier est un milieu de Murashige et Skoog contenant 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; 250 mg.L<sup>-1</sup> de céfotaxime et 50 mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine. On laisse les explants cinq jours sur ce milieu de sélection avant de passer sur le milieu de callogenèse (tableau 13). Les explants sont repiqués toutes les trois semaines. On prélève les bourgeons formés à la base pour les repiquer sur le milieu d'enracinement (tableau 14). Les plantes transformées sont ensuite acclimatées dans une pièce de culture puis repiquées dans du terreau.

### XIV. Activité nitrate réductase et dosage de la teneur en nitrate

### Dosage de la teneur en nitrate

Le dosage de la teneur en nitrate est réalisé selon la méthode décrite par Cataldo et al. (1975). Afin de doser le nitrate, on utilise 10 à 20 mg de matériel végétal lyophilisé que l'on incube 1 heure à 45°C dans 1 mL d'eau. Après une centrifugation de 20 minutes à 10000g afin d'éliminer les débris cellulaire, on ajoute à 50  $\mu$ L de surnageant, 20  $\mu$ L d'acide sulfosalycilique (5% acide salycilique p/v dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11 N). On ajoute ensuite 4,75 mL de NaOH 2 N. La densité optique est lue à 410 nm. Les quantités de nitrate sont exprimées en  $\mu$ g NO<sub>4</sub><sup>-</sup>.g<sup>-1</sup> MF.

### Activité nitrate réductase

### Activité in vitro

Afin de déterminer l'activité nitrate réductase (ANR) *in vitro*, le matériel est broyé dans de l'azote liquide et repris dans 4 mL de tampon 50 mM HEPES-KOH pH 7,5, contenant 0,5 mM EDTA, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0,1 % Triton X-100 (V/V), 10 % glycerol (V/V), 10 % polyvinyl-pyrrolidone (P/V), 50  $\mu$ M leupeptine et 0,5 mM PMSF. Après une centrifugation de 20 minutes à 4°C et 5000 g, le surnageant est utilisé pour le dosage de l'ANR.

L'ANR est dosée dans 400  $\mu$ L de tampon 50 mM HEPES-KOH pH 7.5 contenant 10 mM KNO<sub>3</sub>, 0,2 mM NADH<sub>2</sub> and 10  $\mu$ M FADH<sub>2</sub>. La réaction débute avec l'addition de 100  $\mu$ L d'extrait protéique et une incubation de 5 minutes à 30°C. On stoppe ensuite la réaction avec 50  $\mu$ L de 0.5 M d'acétate de zinc. Le NADH en excès est détruit par l'addition de 20

Solution	an a	Quantité	
Tampon phosp KNO, 0,1 M Propanol	ohate pH 7,5	30 volume 50 volume 1 volume	s s

 Tableau 15:
 Composition du tampon d'incubation pour l'activité nitrate réductase in vivo.

### Matériel et méthodes

 $\mu$ L de phenazine méthosulfate 300 mM. Le nitrite formé est révélé à 540 nm par addition de 350  $\mu$ L de sulphanilamide 11 nM dans 3 M HCl et 350  $\mu$ L of 10 mM N1-naphtylethylene-diamine-dihydrochloride en solution aqueuse. Le taux de protéines solubles est déterminé par dosage colorimétrique selon Bradford. L'ANR est exprimée en  $\mu$ moles NO<sub>2</sub><sup>-1</sup> .mg<sup>-1</sup> protéines solubles.min<sup>-1</sup>.

### Activité in vivo

Pour l'activité *in vivo*, le matériel végétal est pesé puis repris dans 2 mL de tampon d'incubation (tableau 15). On bulle ensuite la solution avec de l'azote gazeux pendant une minute avant de refermer hermétiquement les tubes et de les incuber 30 minutes à 28°C. On ajoute ensuite 1 mL de sulfanilamide et 1 mL de naphtyléthylène. La réaction se déroule pendant 5 minutes à l'obscurité. La quantité de nitrite formé est ensuite mesurée par colorimétrie et l'ANR est donnée en nmoles  $NO_2^{-}$ .g MF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

# Résultats

## Discussion

Chapitre I: Clonage et caractérisation du promoteur du gène de la nitrate réductase chez Cichorium intybus.



Figure 28: Représentation schématique du gène nia de Cichorium intybus. Localisation des différentes sondes utilisées, ainsi que de certains sites de restriction.

Enzyme	pTNG1	pSNG2	pT NG3	13
BamH I	> 800 4085	4085	4085	> 795
Bgl II	> 5387	> 5387	> 5387	> 5387
EcoR I	> 1545	> 1545 3618	3618	> 1545
Hind III	> 3090	> 3090	> 3090 290 995	> 3090
Kpn I	> 1921	> 1921 > 3466	> 3466	> 1921
Pst I	> 285 > 5102	> 5102	> 5102	> 285
Cla I / Sal I	> 3575	> 3575	> 3575 > 1812	>>3575
Pvu II	> 5387	> 5387	> 5387	> 5387
Sal I	> 5387	> 5387	> 5387	> 5387
Sma I	> 5387	> 5387	> 5387	> 5387

Tableau 16:Taille en pb des fragments attendus lors de l'hybridation des sondes pTNG1,<br/>pSNG2 et pTNG3 avec l'ADN génomique de la chicorée.

# Clonage, séquençage et caractérisation du promoteur du gène de la nitrate réductase chez *Cichorium intybus*.

La séquence codante du gène de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* a été établie au sein du laboratoire (Palms *et al.*, 1996). C'est une séquence de 5387 paires de bases, contenant 3 introns et qui code pour une protéine de 920 acides aminés.

Cependant, afin de mener à bien une étude du gène au niveau moléculaire, le clonage et le séquençage du promoteur de ce gène *nia* étaient nécessaires.

Dans un premier temps, nous avons décidé de cribler une banque d'ADN génomique disponible au laboratoire afin d'en isoler un clone contenant le fragment d'ADN désiré. Cependant, après divers criblages, nous étions dans l'impossibilité d'isoler un clone intéressant. Les clones obtenus ne présentaient que des séquences tronquées et chevauchantes d'autres gènes. Nous avons décidé d'abandonner cette voie et de nous orienter vers une autre approche. Celle de la Réaction de Polymérisation en Chaîne Inverse (PCR-I) nous semblait la plus appropriée à notre problème, d'autant plus que certains promoteurs avaient déjà été isolés de cette façon (Warner *et al.*, 1993; Forser *et al.*, 1994a).

### I. Isolement du promoteur nia par PCR-Inverse

La PCR-I (cf « Matériel et Méthodes » figure 19) permet d'amplifier une région d'ADN inconnue adjacente à une région connue (Ochman *et al.*, 1988; Triglia *et al.*, 1988; Silver et Keerikatte, 1989).

Il nous a fallu tout d'abord définir le fragment génomique à amplifier. Autrement dit, il a fallu rechercher une enzyme de restriction permettant l'obtention d'un fragment d'ADN contenant le promoteur et une partie du gène *nia*. Ce fragment a été déterminé par hybridation moléculaire d'ADN génomique digéré avec diverses enzymes.

### I.1. Hybridations sur ADN génomique

La sonde qui semblait la plus adaptée à la recherche du fragment contenant le promoteur *nia* était pTNG1 (figure 28), puisqu'elle représente la région 5'-terminale du



Enzyme de restriction	Taille des fragments (en kb)	Taille des fragments attendus
BamH I	11 5,7 3,9 3,5 1,75	> 800 4085
$\mathrm{B}gl$ II	>>12 2,7	> 5387
EcoR I	>10 9,2 7,6 5,4	> 1545
Hind III	>>12 9,6 2,9 2,5	> 3090

Figure 29:	Autoradiographie des produits de digestion d'ADN génomique de chicorée
	hybridés avec la sonde $pTNG_1$ et résultats de la taille des produits hybridés.



Sonde pSGN2

Sonde pTNG3

Enzymes de restriction	Sonde pSNG2	Sonde pTNG3	
	Taille des fragments (en kb)	Taille des fragments (en kb)	
BamH I	4,1	4,1	
Bgl II	>12	>12	
EcoR I	3,6	3,6	
Hind III	3,1	1,1 3,1	
Pvu II	>> 12	>> 12	
Sal I	>> 12	>> 12	
Sma I	>> 12	>> 12	

Figure 30: Autoradiographie des produits de digestion d'ADN génomique de chicorée hybridés avec les sondes pSNG2 et pTNG3 et résultats de la taille des produits hybridés.

gène, à proximité du promoteur. Une hybridation moléculaire d'ADN génomique digéré avec diverses enzymes de restriction a donc était réalisée (figure 29).

Pour BamH I, on attendait deux fragments (tableau 16), celui d'environ 4 kb qui correspond à une grande partie de la séquence codante et un autre de taille supérieure à 800 pb (puisqu'on ignorait à quel niveau se situait le site de coupure en amont du gène). Cependant, on a dénombré cinq fragments s'hybridant (figure 29). Pour EcoR I, Bgl II, et Hind III, un seul fragment de taille inconnue était attendu alors qu'on en recense également plusieurs.

L'hybridation de plusieurs fragments, alors qu'un seul (ou deux dans le cas de BamH I) était attendu, mettait en doute l'existence d'un gène unique *nia* chez la chicorée. Une hybridation moléculaire avec la sonde pNRS (figure 28) avait pourtant établi l'existence d'un seul gène (Palms *et al.*, 1996). Nous avons donc procédé à d'autres hybridations afin de déterminer le nombre exact de gènes *nia* chez *Cichorium intybus*. De telles hybridations ont alors été effectuées avec les sondes pSNG2 et pTNG3. Les mêmes enzymes que pour l'hybridation avec pTNG1 ont été utilisées ainsi que d'autres ne coupant pas dans la région codante du gène *nia* (figure 30).

Lorsqu'on effectue l'hybridation avec la sonde pSGN2 (figure 30), on obtient, pour chaque digestion enzymatique, un seul fragment. Ces fragments ont des tailles qui correspondent aux tailles attendues (tableau 16). Le fragment de 3100 pb (alors que le fragment attendu devait être supérieur à 3090 pb) s'hybridant avec pSNG2 lorsque l'ADN génomique est digéré par *Hind* III, laisse supposer l'existence d'un site de coupure par cette enzyme non loin de l'ATG dans la séquence promotrice. Sur l'autoradiographie de l'ADN génomique digéré par *Eco*R I et hybridé avec pSGN2, on remarque deux bandes. Celle à environ 3600 pb est de forte intensité et bien visible sur la reproduction réalisée ici. Mais il existe une deuxième bande, à plus de 12000 pb, de très faible intensité et que l'on ne peut pas voir sur la représentation dans la figure 30.

Pour l'hybridation par pTNG3 (figure 30), les tailles obtenues pour les enzymes *Bam*H I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Pvu* II, *Sal* I et *Sma* I correspondent aux tailles attendues dans le cas de l'existence d'un gène unique. Il existe cependant un problème pour la digestion par *Hin*d III. En effet, alors que l'on s'attendait à hybrider trois fragments (290, 995 et supérieur à 3090)(tableau 16), nous n'obtenons l'hybridation que de deux fragments de 3100 et 1100 pb. A cela on peut avancer deux hypothèses. Soit la digestion de l'ADN génomique est partielle et dans ce cas le site *Hin*d III en 3385 sur la séquence codante du gène *nia* n'est pas coupé et on obtient un fragment de 995 + 290 = 1285 pb. Soit il s'agit d'une erreur de

67
ATSOX CCTCCTCGAAAGAAGAAGACGCGCGCGGGGTGTTGTCGTCGATAGTCGCGGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	ptNG1	CTGTGGAAAAC-CGCCAGTTCCGCC
<pre>pTNG1 ACGAACCTGGTCTATCAGGCGCCGCCGGTGTTATCATCAGC-CCTAACCAACCGCGC ArSOX TCCTACCTGTCTATCAGGCCGGCCGGCGTGCTAATCAACCACCGCCGCCG TCCTGCCCTTCTCTAAGCGCGCGCGGGACGTGTAACTACCCCGCGGCGTGCTAAGAGAGTTATG-A ArSOX GCCCGGACATCGTGTCTATCTGCGTCCGCCGCGTGTCTAGAGAGGAAACTTCCCTTTCTAAA ArSOX AGCGAAATCTGCGGACCTCCGAGTGGAAAACCTCCCTTTTG ArSOX TCCG-CACCCTTACTGGATGATCCGGACCGCGTTGTGAACACCTCCGTTTTG ArSOX TCCG-CCACCTTACTGGATGATCCGGACCGCGATTGGAAACCTCCCTTTTG ArSOX TCCG-CCACCTTACTGGATGATCCGGACGCGAACCCACCAATGGTC ArSOX TCCG-CCACCTTACTGGATGATCCGGACGCGAACCCACCAATGGTC ArSOX TCCG-CCACCTTACTGGATGATCCGGACGCGAACCCACCAATGGTC ArSOX TCCG-CACCCTTACTGGATGGAGATCAATGGATCGAGCGCAAACCCACCAATGGTC ArSOX CCGGTAACAGGACCCCCCTCTCCATAGGACGCGAACCACCACAATGGTC ArSOX CCGGTAACAGGACCCCCCTCTCCCTACGCGCGCGAAAACCACCGACCAATGGAGCGCGACAA ArSOX CCGGTAACAGGACCCCCCCTTCCATACGGCCGGCAAACCACCGACCAATGGAGCGGCGAA ArSOX CCGGTAACAGGACCCCCCCTCTCCATACGGCCGGCGCAAA ArSOXGGGATGGTGCTAATGGCACGGCGTTGGAGAAAGCCGGCGGCGAA ArSOXGGGATGGTACTAATGGCACCG-CTGGCGTAAAACGGGCGGGAAA </pre>	ATSOX	CCTCCTCGAAAGAAGAATGCCTGGAATTAGAGGTCCTTCGGAATACTCGCAGGAACCACC
<pre>prinsi Acd=-AACCTGGTCTATCGCCGCCGGTGTGTGTGTGTCATTCAGC-CCTAACCACCCCCC Arsox TCGTCATCTTCTCTCTCAACGCCAAGGAACCTTCAACGCCGGCCTCC-CC Arsox TCGTCGTCTTAGTCCTCTCGGAACGGAACGGACCCGGCGGGGGGGG</pre>		* * **** ** ** ** ** ** **
ATSOX TCGTCACCCCTTCTCTCAGAGTAACGCAAGGAACCTTTCAAGGCCGAGCCTCCCC PTNG1 GTTCTGATTCACCCATCCGGAACTGTAACTACCCCGCGGGCTGCTAGAGAGTTTATG-A ATSOX GCTCGACCCTTATTCCTCGAGACTGTAACTACCCCGCGGGCTGCTAGAGAGTTTATG-A ATSOX AGCGAAATCAGGTGAGCCATCGAAGTACTGTGGAAGGAAAAGACGAA ATSOX AGCGAAATCAGGTGAGCCATTGAAAGTACCGAACTCCGAGTGGAAGGACGCTTGTGAAAGCTCCGTTTTG ATSOX TCCC-GCACCCTTACTGGAGCCATTAAAAAGGTCGAACTCCGGAGTGGAAAGCTCCGTTTTG ATSOX TCCC-GCACCCTTACTGGATGAACTACCGAAGCTGCGAAGCTACGTTCGA ATSOX TCCCACCCTTACTGGAGCCATTGAAACTGCGACGGACACCCATCAATGGTTC ATGCAAGGAGTCACACGGGCACTGCAGAACGAAGTAGGAGCGAAGCCATCGATCGATCGATCGAT	pTNG1	ACGAACCTGGTCTATCCGCCGCCGGTGTTGTTCGTTCATTCAGC-CCTAACCACCGCC
pTM31         GTTCTGATTCACCLAPCGGALCTGATLACTACCCGGGGGGGTGCTGAGAGAGTTTATG-A           ATSOX         GCCCGGGCCTAGTCCACTCTATGTCACACCCGGTGGACCTTTGTACA           DTM51         GCCCTAAGAACTTCCTGCTGAGACCTATGAAACTACCCGGACTGGAAAGCAAGACGAA           ATSOX         AGCGAAATGTGGACGCCATTGAAAAGTACAAGACGAA           ATSOX         AGCGAAATGTGGATGAGAACTCCGAGTGGAAAGCTCCGTTTTG           DTM51         GCCGATTATCGTGAGGCACTGCAGATCACTGGAGGGCGAACCCATCAAAGTGTC           DTM51         ACCCAAGAGATCAGGGCACTGCAGATCAATGGATCGAGGCGAAACCCATCAATGGTTGA           ATCAAAGACTCAGGGCACTGCAGATCAATGGATCGAGGCGCAAACCATCAATGGTTG         ATCAAAGGCATCAGGGCACTGCAGATCAATGGATGTGAAAGATCTACGGCTGCGTAA           PTM51         ACCCAAGAGAATCAGGGCACCGCCTCTTCATACGTCCGTAGAAAGTGTTGAGATGTTGAGGTGTTGAA           PTM51         ACCCAACGGGGAGGATCACCCCTCTTCATACGTCCGTGGCGTAAAAGTGCCATGGGTGGTGAAAAGCCCCCCGGGAAGATGCGCGTGGAGAATGGGGGCGCGAAAGCGCCCGGGGGAAAGTGCCGCGGGGGGGG	ATSOX	TCGTCACCCTTCTCCAAGGTCAACGCCAAGGAACCTTTCAACGCCGAGCCTCC-CC ** * *** *** * * * * * * * * * * * *
ATSOX GCCGGGCCTAGTCTCATCTATOTCACTCCCGCGCGCTTATCAAGACGAT Spe I  pTNG1 CGCCTAAGAAACTTCCTCCTGAGACGTACGATACTA.GTGACGATGAAGAAGACGAA ATSOX AGCGAAA	pTNG1	GTTCTGATTCACCCATCCGGAACTGTAACTACCCCGCGGCTGCTAGAGAGTTTATG-A
Spe I pTNS1 CGCCTAAGAAACTTCCTCCCGAGACGATAGATACACCCATGGATAGACGAAGACGAA ATSOX AGCGAAATCATGGAACTCCGATGGTGACACCCTTCAAAGCTAC pTNS1 GCCGATTATCGTGACGCCATTAAAAAAGTCGAACTCCGATGGTGACACCCTTCAAAGCTAC TCCCCCCTTCTGGATAGATCCAGAAC-CCGATGAAAGCCCCCTTCAAAGCTCTT TTSOX TCCG-TCCCCTTGGATAGATCCAGAAC-CCGATGAAAGCCCCATCCATGGTCC ATSOX ATCAAAGACTCAGGGCCCTCCCAAAGTACCAATGGATCCTAGGACCCATCCAT	ATSOX	GCTCGGCCTTAGTCTCATCTTATGTCACTCCCGTCGACCTTTTCTACA
Spe I           CGCCTANGAAACTTCCTCCTGAGACGTACGTACTACTACTCACGTCACAGCGAAAG           ANSOX           AGCGAATCARGGTCCCATCGCATTGTGATACCCCTCTAAAGCTAC           pTNGI           GCCCGATTAAAAAGTCGAACTCCGAAGTGGAAGCTCCCTTTAAAGTCT           pTNGI           ACCCAAGAGATCAGGGCACTGCAGATCGAAGCGCCACCCATCAAATGGTTC           pTNGI           ACCCAAGAGATCAGGGCACTGCAGATCGAAGCGCCACCTTGAAATA           pTNGI           ACCCAAGAGATCAGGGCACTGCCATCCAAAGTACGAGCGCAACCCATCAAATGGTCTACTCTCAGTG		* ** * * * * **** *** **** * *** * **
pTNGI CGCCTALGAAACTTCCTCCTCAGACGTACGTACGTACGTACGTACGT		Spe I
ATSOX ACCGAATCATGGTCCCATTGTTGATCACCTTCALAGCTAC pTNG1 GCCGATTATCGTGACGCCATTAAAAAGTCGAACTCCGAGGTGGACGCCGTTTTTG ATSOX TCCG-TCACCGTTACTGGATGACTCCAGAAC-CCGATGAAAGCTCTTT TTGT ACCGAAGAACAGGGCACTGCAGATCAATGGATCGAGCGCAACCCATCAATGGTTC ATGCAAAGAACACCGGTCCCCCCCAAAGTACAATGGATCGAGCGCAACCCATCAATGGTTC ATGCAAAGACATCAGGGCCCCCCGCAAAGTACAATGGATCGAGCGCAACCCATCAATGGTTG ATGCAAAGACATCAGGGCCCCCCTCTCAATTACGTCCGAACCATGGAGCGCGAA TGCAACGAAGGGATTGCACCCCTGTCATTACGTCCGTGACATGTTGAGATGTTGGA ACATGGGTTCATCACCCCCCGGACCCTCTCATTACGTCGGTGAAAAGACTGGGGGTGGGCGGAA TGCAACGAGGGGGGACGTCGACCACCCTGTCATTACGGCCTGGAAACATGTGGGGGATACCAAAGGCACG TGGCACCTGGGAGAGTTGCACCCCCGGCGCGGAGGTTGGGGCGTTGGGGGATACCAAAGGC TGGCCGTCACCACCCCGGGAGGGGAGGTTCGGAGGCCTGGGGGATACCAAAGGC TGGCGGTCACCACCCAGCGTGGAGGAGGATTCGAGCCTGGGGATACCAAAGC TGGCGGTCACCACCCAGCGTGGAGGAGGATTCGAGCGTTGGGGGATACCAAAGC TGGCGGTCACCACCCAGCGTGGAGGAGGATTCGAGCACGACGTTGGGGGATACCAAAGC TGGCGGTCACCACCGGGAGGGGGAGGCCGTGGGGGGTGTCGGGGGATACCAAAGC TGGCGGTCACCACCGGGAGGGGGGGTTCGAAGCACGACGTTGGGGATACCAAAGC TGGCGGTCACCACCGGGGAGGGGGGGGTTCGCGGGGGGTGCCCTTAA TGCTGGCCGGGAGGGGGGAGGCCGGGGGCGCTGTGATAGCGGCCATAAACCAGACGT TGACCGGGGAAGGGGGGGGGCGCGGGGGGGTGTCCGCGGGGGCGCATTACCCCTTA TGC	pTNG1	CGCCTAAGAAACTTCCTCCTGAGACGTACGATACT-AGTGACGATGAAGAAGACGAA
<pre>     tree tree tree tree tree tree tree</pre>	ATSOX	AGCGAAATCATGGTCCCATCCCCATTGTTGATCACCTTCAAAGCTAC
pTHGI         GCCGARTATCOTGACGCCATTAAAAGTCGAACTCCGAGTGGGAAGCTCATTTTTG           htsox         tcca-tagaaccettagaacaagaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaa		** **** ** ** ** * * * * ** *** * ** *
ATSOX       TCCG-TCACCCTTACTGGATGATCCACGAC-CCGAGAAAGCTCTTT         yTNG1       ACCCAAAGGACACGGCACTGCAGATCAATGGATCGAGCGCAACCCATCATAGGTG-GC         yTNG1       ACCCAAAGGACACGAGCCCCTCTCCACAAAGTCAATGGATCGAGCGCACCCATCATAGGTG-GGA         yTNG1       GGTCTCACTGGAAAAACACCCATTCAACTCCGAGCCACCTTTGAATA-AGCTCATGGA         yTNG1       ACATGGGTTCATCACCCCTGCCCTTCATTAGGCCCGTTGGAATA-AGCTCATGGGCGGAGAA         yTNG1       ACATGGGTTCATCACCCCTGACCCTTCATTAGGCCCGTAACCAATGGTCCGGTGCCTAA         yTNG1       ACATGGGTTCATCACCCCTGGACGTGGAGATTGCGGCTGGCGTAACCAAAGGC	pTNG1	GCCGATTATCGTGACGCCATTAAAAAGTCGAACTCCGAGTTGGAAAGCTCCGTTTTTG
pTNG1       ACCCAAGAGATCAGGGCACTGCAGATCAATGGATCGAGCGCAACCCATCAATGGTTC         hTS0x       ATCAAAGACATCAGGTCCTCCCCAAGATCAATGATACTACTTCTCTCAGGGTGTGTGA         pTNG1       GTCTCACTGGAAAAACACCCATCAATCTCCGAGCCACCTTTGAATA-AGCTCATGGA         hTS0x       CGGTAACAGAAGGACTCCCTT-CATTCAGTCCGAAACCATGGTCCGGTGCCTAA         hTS0x       CGGTAACAGAAGGACTCCCTGACCTTCATTAGGCACGC-CTTGAA-CAATGGTCCGGTGCCTAA         hTS0x      TGGGGTGTTCTGCTATTGGCAACG-CTGTCTGGGGGGGGGG	ATSOX	TCCG-TCACCCTTACTGGATTGATCCAGAAC-CCGAGAAAGCTCTTT *** * * * * * * ** *** *** **** *
PING1       ACCANAGACATCAGGTCCOTCACATCATACATCATACTACCTATACTACTCTTTAAGCTCATCGTAGA         PTNG1       GTCTCACTGGAAAACACCCATCAAACTCCGAAGCAACCTTTAAATA-AGCTCATGCA         PTNG1       ACATGGATACAGACGCCATCGAGCAAAGTTAGGAACATGGTCCGGGCGAA         PTNG1       ACATGGGTTCATCACCCCTGAACCCTCTTCAATTACGTCCGTAGAGAGTGGGGGCGAAA         TSOX      TGGGGTGGAAAAGTGTGGACCGCCGCCGCCGCGCGCGCGAA         TSOX      TGGGGTGGAGATTGGACGGTGGGAGAATTCCGGTGGAAAAGACCTGGCGGTT         TSOX      TGGCCCTTTGAGCTGC-GTGGTGGAAAAGACCTGAGGCGGATA         TSOX	~~~~	
ATSOX ATCAMAGNATIONACIOCALAGAGACCONTROLATIONAL	DINGT	
pTNG1       GTCTCACTGGAAAACACCCATTCAACTCCGAGCCACCTTTGAATA-AGCTCATGGA         pTNG1       ACATGGGATTGACACCCCTGCAT	AISUA	* * **** ****** * ** * ** ** ***** * ** ** ** ** **
ATSOX CGGTARCAGAAGGATGGCCATGAGCAAGTTAGGAGCTGGGGGGGCGGAA ATSOXTGGGATGGTGTG-CGGCCTGTGGGTGGGAGCGGGGGGGGGG	DTNG1	GTCTCACTGGAAAACACCCATTCAACTCCGAGCCACCTTTCAAATA-&GCTCATGCA
ALION     COUNTERCATCACCCCCGGACCCCCTCTCATTACGTCCGTAACCATGGTCCGGTGGGCCAAA       pTNG1     ACATGGGTTCATCACCCCCGGACCCCTCTCATTACGCCCGGTAACCATGGTCGGGGGGCGAAA       ATSOX    TGGGATGTTTC-TGCTATTGGCACG-CTGGTGAAAAAGACCTGCGCGCGTA       pTNG1     CGCCACCTGGGAGGATTGGACGGTGGAGATATGCGGCTTGGTGAAAAAGACCTGCCGAGGCGTAA       pTNG1     CAGTATGACCCAGCTTGTCAACGAGTTCCCAAGC-AGGAGAGTTCCCGGTGAGCATAAAGAC       pTNG1     CAGTATGACCCAGCTTGTCAACGAGTTCCCAAGC-AGGAGAGTTCCCGGTGAGCGTAGTCT       aTSOX    TGACTGCTTCTACCAATTTAGGAGCCAGACATGTTGAGATTCGTTAGTGT       aTSOX    TGACTGCTTCTACCAATTTAGGAGCCAGACATGTTGAGATCGTAAGGAG       pTNG1     CGCCCGGGAACCGCCGCGCGGGGAAATCTAACTCGGTTAGTCACTCTAA       aTSOX     TGAGGTTCAACTGGGGCCGCCGCCGGGATAT-CTAACACGCAAAAGAATGA       aTSOX     GGTGCCACAAATCCTGGGGCCGCCGCCGGGATAT-CTACTTCGGTTAGAGATAAATGG       aTSOX     GGTGCCACAAATCCTGAACGGATCACCGAATGTTTCCATCCGGTTATGAGATAAAGAG       aTSOX     GGTGCCATGGGTGTCACATCGAAAAAATGGCGTGGATTGC       aTSOX     AGAGACCCGAAAAAGGGATACCGGATTCCCAATTCCATGTGTCCCTGGTGGATTGC       aTSOX     AGAGACCCGAAAAAGGGTGCAAAATGCGGACCAGAGGGGGCGGAGG       aTSOX     AGCTTCCCGGCGGAGGTTCCAAATAGCGGACCAGATGGGGACCAAGGAGGAGGATGCCGGAAATGCCAGGAAACGAGGGGCCAAATGTGTCATCGCTGCAAAAAAACCAGGGAACAAGGGGGCCGAAAAGGATGCACATGGCAAAAACCAGGAAAAGAGTGGGAAAAGAGTGGGAAACCATGGAAACCATGGCGAAAGGATACCACCGGAAAGGATGCAAAACCGGGAACCACGGAAAAGAGTGGCAAAAACCGGGGGGGG	ATSOY	CCCTABCAGACACCCCATICANCICCOAGCCACCIIIGAN - TA AGCICAIGCA
pTNG1       ACATGGGTTCATCACCCCCTGACCCTCTTCATTAGCTCGTAACCATGGTCCGGTGGGCGAAA         ATSOX      TGGGATGTTC-TGTCTGACGCGCGGTGGGAGATAGCGCGGGGGGGAGAAA         pTNG1       CGCCACCTGGGAGGATGGACGGTGGAGATATGCGGCTTGGTGAAAAGACCTGCGCGGTTT         ATSOX      TGGCC-TGCTCACGAGTTCCAAGC-AGGGAGTTCCGGGGAACCAAAGC         ************************************	AISUA	* ** * * ** **** **** *** * ** * ** **
ATSOX	DTNG1	ACATGGGTTCATCACCCCTGACCCTCTCATTACGTCCCTAACCATCCCCCTCACCCTAA
pTNG1       CGCCACCTGGGAGGATTGGACGATGGAGATATGCGGCTTGGTGAAAAGACCTGCCGCGTT         xTS0X	ATSOX	TGGGATGTTTCTGCTATTGGCAACG-CTGTCTGGGGTGGGG
pTN61       CGCCACCTGGGAGGATTGGAGAGTTGGGAGATATGCGGCTTGGTGAGAAGACCTGCGCGTTT         ATSOX		
ATSOX       CTGGCCGATGTTTTTAGCTTG-TGGGGATACCAAAGC	pTNG1	CGCCACCTGGGAGGATTGGACGGTGGAGATATGCGGCTTGGTGAAAAGACCTGCGCGTTT
pTNG1CAGTATGACCCAGCTTGTCAACGAGTTTCCAAGC-AGGGAGTTTCCGGTGACGTTAGTTATSOXTGACTGCTTCTACCAATTTAGAGCCAGACATGTTGAGTCTTAATGTpTNG1GCGCCGGGAACGCCGGAAAGGAGAGAATCTGACAAATSOXTGATCGCTGTAAGAGGAGAAAATGGAGGCCCTTATAAGGCGTCAATCACTCTAA***********************************	ATSOX	CTGGCCCGATGTTCTTGAGCTTG-TGGGGATACCAAAGC * *** ** * * * * * ***** ** * ***
ATSOXTGACTGCTTCTACCAATTTAGOAGCCAGACATGTTGAGTTCGTTAGTGTpTNG1GCGCCGGGAACCGCCGCGGAGAGGAGCAGAATCTGACAAACAGACGATATSOXTGATGCTGTAAAGGAGCAGAAT-CTGCGCCTATAAAGGCGTCAATCACTCTAAATSOXTGCTGGGGGCGCCGCCGGGGATAT-CTACTTCGGTT-TGGAAAGGATSOXGTCAAGCCACAAATCCTGAAGCGGATGTTCTACT-CGCTATGAGATGAATGG***********************************	pTNG1	CAGTATGACCCAGCTTGTCAACGAGTTTCCAAGC-AGGGAGTTTCCGGTGACGTTAGTCT
TING1     GCGCCCGGGAACCGCCGGAAGGAGCAGAATCTGACAAAACAGACGAT       TGATCGCTGTAAGGAGCAGAAATGGGGGCCCTTATAAGGCGTCAATCACTCTAA       ************************************	ATSOX	TGACTGCTTCTACCAATTTAGGAGCCAGACATGTTGAGTTCGTTAGTGT
pTNG1GCGCCCGGGAACCGCCGGAAGGAGCAGAATCTGACAAAACAGACGATATSOXTGATCGCTGTAAGGAGGAAATGGGGCCCCTATTAAGGCGCTCAATCACTCTAA* *** * *****************************		**** **** ** * *** *** * * * * * * * *
ATSOXTGATCGCTGTAAGGAGGAAAATGGGGCCCCTTATAAGGCGTCAATCACTCTAA ************************************	pTNG1	GCGCCGGGAACCGCCGGAAGGAGCAGAATCTGACAAAACAGACGAT
pTNG1AGGGTTCAACTGGGGCGCCGCCGGGATAT-CTACTTCGGTT-TGGAAAGG GTCAAGCCACAAATCCTGAAGCGG-ATGTTCTACT-CGCTTATGAGATGAATGG ************************************	ATSOX	TGATCGCTGTAAGGAGGAAAATGGGGGCCCTTATAAGGCGTCAATCACTCTAA * *** * ****** * *** * ** * * * * * *
ATSOX       GTCAAGCCACAAAATCCTGAAGCGGATGTTCTACT-CCCTTATGAGATGAATGG         TSOX       GGTGCCATTGGTTCATATCCTGAAAAGATGCGGGATTTACAGC         ATSOX       AGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAAGGGTGGTGTCCCTGGTGTGAATGG         TSOX       AGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAAGGGTGGTGTCCCTGGTGTGATTGG         TSOX       AGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAAGGGTGGTGTCCCTGGTGTGATTGG         TSOX       AGAGACCCTGGAACAGGGATCACGGATTCCCATCAATGTGTGCTTCGAGGGGGGCGGAGG         TGCTCGTCGGTCGGCGCGGAGGTTCGAATGCATTGCCAAATGGTCATCGCTGAAAAAAGACCAGGG       ************************************	DTNG1	
TNG1GGTGCCATTGGTTCATATCCTGAAAAGATGCGGGATTTACAGC AGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAGGGTGGTGTCCCTGGTGATGATTGG *** *** *** **** ********************	ATSOX	GTCAAGCCACAAATCCTGAAGCGGATGTTCTACT-CGCTTATGAGATGAATGG
pTNG1GGTGCCATTGGTTCATATCCTGAAAAGATGCGGGATTTACAGC AGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAGGTGGTGTCCCTGGTGTATTGG *** *** **** **** *******************		* * *** *** *** * ** ***** ** ** ***
ATSOXAGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAGGGTGGTTGTCCCTGGTGTGATTGG * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	pTNG1	GGTGCCATTGGTTCATATCCTGAAAAGATGCGGGATTTACAGC
pTNG1CGGAAGAAAGGCGCACTCAATGTGTGCTTCGAGGGGGCGGAGG TGCTCGTCGGTCGAATGGCTTGATTCCATCAATGTCATCGCTGAAGAAAGCCAGGG *** *** *** *** *** *** *** *** *** **	ATSOX	AGAGACCCTGAACAGGGATCACGGATTTCCGTCAAGGGTGGTTGTCCCTGGTGTGATTGG * * * * ** ** * *** * *** ** ** ** ** *
pTNG1CGGAAGAAGGCGCACTCAATGTGTGCTTCGAGGGGGCGGAGG ATSOXTGCTCGTCGGTCAAATGGCTTGATTCCATCAATGTGCATCGCTGAAGAAAGCCAGGG *** *** *** *************************	- 5101	
ATSOXTGCTCGTTCGGTCAAATGGCTTGATTCCATCAATGGCATCGCTGAAGAAAGCCAGGG *** *** *** *** *** *****************	pTNG1	CGGAAGAAAGGCGCACTCAATGTGTGCTTCGAGGGGGGCGGAGG
pTNG1ATCTTCCCGGCGGCGGAGGTTCCAAATACGGGACCAGCATAAA ATSOXATCTTCCATGCAAAA-AGATTACAAA-ATGTTTCCACCCTCTGTCAATTGGCATAATATC ** ** ** ** ** *** *** *** **** *******	ATSOX	TGCTCGTTCGGTCAAATGGCTTGATTCCATCAATGTCATCGCTGAAGAAAGCCAGGG *** ** *** * **** * ****** * *** ** **
ATSOXATTCTTCATGCAAAA-AGATTACAAA-ATGTTTCCACCCTCTGTCAATTGGCATAATATC ** ** ** ** ** ** *** **** **********	pTNG1	ATCTTCCCGGCGGCGGAGGTTCCAAATACGGGACCAGCATAAA
pTNG1GATCGAGATGGCAA-TGGATCCGGCGAGGGATATCATATTG AACTGGTCCTCTAGGAGACCGCAAATGGATTCCCTGTTCAGAGATGCAATCTGCTCTGTG ***pTNG1GCGTACATGCAAAACGGGGAAAAGTTGTCACCTGATCA-CGGATTCCCGG GAGGATGTGCAAATGGTGAAACGGGGAAAAGTTGTCACCTGATCA-CGGATTCCAGGA ***pTNG1TGAGGATGTCATCCAGGATCATCG-GCGGTAGGATGGTGAAATG GGTGGACGCGGGATAGAAAGAGTGGACATATCCCTGGATGGAGGCAAAACTG ****pTNG1GGTGGACGCGGGATAGAAAGAGTGGACATATCCCTGGATGGAGGCAAAACTG ************************************	ATSOX	ATTCTTCATGCAAAA-AGATTACAAA-ATGTTTCCACCCTCTGTCAATTGGCATAATATC ** * * ** ** ** ** ** ** *** *** ***
princi       AACTGGTCCTCTTAGGAGACCGCAAATGGATTTCCCGGCC-GGAGGGAGTGCAAATCGCTCGTG         AACTGGTCCTCTAGGAGACCGCGAAATGGATTTCCCTGTCAGAGTGCAATCTGCTCTGTG         * **       ****       ****         pTNG1       GCGTACATGCAAAACGGGGAAAAGTTGTCACCTGATCA-CGGATTCCCGG         ATSOX       GAGGATGTGCAAAATGGTGAAGCCTGGAAAGGTAAGTATCAAAGGATATGCGGTTTCAGGA         * **       ****       ****         pTNG1       GCGGAGGTGATCATTCCAGGATTCATCG-GCGGTAGGATGGTGGAAATG         ATSOX       GGTGGACGCGGGATAGAAAGAGTGGACATATCCCTGGATGGAGGCAAAAACTG         * ***       ****       *****         pTNG1       GGTGGACGCGGGATAGAAAGAGTGGACCATATCCCTGGATGGAGGCAAAAACTG         * ***       *****       ************************************	DTNC1	
pTNG1GCGTACATGCANAACGGGGAAAAGTTGTCACCTGATCA-CGGATTCCCGG GAGGATGTGCAAATGGTGAAGCCTGGAAAGGTAAGTATCAAAGGATATGCGGTTCCAGGA ************************************	ATSOX	ARCTGGTCCTCTAGGAGACCGCARATGGATTCCCTGTTCAGAGTGCARTCTGCTCTGTG * ** **** **** **** ** *** **** ***
pTNG1       GCGTACATGCAAAACGGGGAAAAGTTGTCACCCGATCA-CGGATTCCCGG         ATSOX       GAGGATGTGCAAATGGTGAAGCCTGGAAAGGTAAGTATCAAAGGATATGCGGTTTCAGGA         * * * ****** * * * **** * * *** * ***         pTNG1       TGAGGATGATCATTCCAGGATTCATCG-GCGGTAGGATGGTGAAATG         ATSOX       GGTGGACGCGGGATAGAAAGAGTGGACATATCCCTGGATGGAGGGCAAAAACTG         * *** * * * *************************		
ATSOX       GAGGATGTGCAAATGGTGAAGCCTGGAAAGGTAAGTATCAAGGATATGCGGTTTCAGGA         * * * ****** * *       **** *** ****************************	PINGT	GLGIAURIGUAAAAUGGGGAAAAGTTGTCAUCTGATUA-UGGATTCCCCGG
pTNG1       TGAGGATGATCATTCCAGGATTCATCG-GCGGTAGGATGGTGAAATG         ATSOX       GGTGGACGCGGGATAGAAAGAGTGGACATATCCCTGGATGGAGGCAAAAACTG         * *** *       * *** *       * *** *         pTNG1       GTTG-AAGCGTATCATAGTAACGACGCCGGAGTC-GGAAAGTTATTACCACTTCAAAGAC         GGTGGAAGCTTCTAGAACGCAGGAACCAGGAAAGCAGTACATCTCAGAA         * *** ***       * *** ***         pTNG1       AACCGCGTGTTGCCGTCGCACGTGGACGCCCGAGCTAGCT	ATSOX	GAGGATGTGCAAATGGTGAAGCCTGGAAAGGTAAGTATCAAGGATATGCGGTTTCAGGA * * * ****** * * **** * * *** *** ***
pInG1       GGTGGAAGGTTCCTTCCTGGATGGAGGGCGAAAAACTG         w *** *       * *** *         pTNG1       GTTG-AAGCGTATCATAGTAACGACGCCGGAGTC-GGAAAGTTATTACCACTTCAAAGAC         ATSOX       GGTGGAAGCTTCTAGAACGACGCCGGAGTC-GGAAAGTTATTACCACTTCAAAGAC         ATSOX       GGTGGAAGCTTCTAGAACGACGCAGGAAACCAGGAAAGCAGTACATCTCAGAA         x *** ****       *         x *** ***       *         x *** ****       *         x *** ****       *         x ***       *         x **       *         x ***       *         x ***       *         x **	DTNG1	#CAGCA#CA#CA##CCACCA##CA#CC_CCCC#**
ATSOX       GUIGGAGGGE - CG GGAIRGRAGGEGGAGACATATICCC IGGAIGGAGGEGAAAATT         pTNG1       GTTG-AAGCGTATCATAGTAACGACGCCGGAGTC-GGAAAGTTATTACCACTTCAAAGAC         ATSOX       GGTGGAAGCTTCTAGAACGCAGGAAACCAGGAAAGCAGTACATCTCAGAA         * *** ****       *         ******       *         *******       *         ********       *         *********       *         **********       *         ************************************	DINGT	
pTNG1       GTTG-AAGCGTATCATAGTAACGACGCCGGAGTC-GGAAAGTTATTACCACTTCAAAGAC         ATSOX       GGTGGAAGCTTCTAGAACGCAGGAACCAGGAAAGCAGTACATCTCAGAA         * ** **** * *       * ***** *** * ***********************	ALOVA	* *** * * **** * * * * * * * ** ** *****
ATSOX       GGTGGAAGCTTCTAGAACGCAGGAACCAGGAAAGCAGTACATCTCAGAA         * ** **** * *       * ******* * * ***********************	pTNG1	GTTG-AAGCGTATCATAGTAACGACGCCGGAGTC-GGAAAGTTATTACCACTTCAAAGAC
pTNG1       AACCGCGTGTTGCCGTCGCACGTGGACGCCGAGCTAGCTA	ATSOX	GGTGGAAGCTTCTAGAACGCAGGAACCAGGAAAGCAGTACATCTCAGAA * ** **** * * * * * **** * ****** * ****
pTNG1     AACUGUGTGTTGUUGTUGUAUGTUGAUGTUGAUGTUGUAUGUA		
AIDUA UAUAUTUUAUTUAUAAATUU	DINGT	
	ATSUL	CACAGUTCCAGTGACAAATGG

Figure 31: Alignement de la sonde pTNG1 avec la séquence nucléotidique de la sulfite oxydase d'Arabidopsis thaliana (ATSOX). Les nucléotides conservés sont notés par \*.

lecture de la séquence du gène lors du séquençage, et dans ce cas le site *Hin*d III en 3385 n'existe pas.

On peut conclure à la vue des résultats des hybridations par les sondes pSNG2 et pTNG3, qu'ils confirment ceux obtenus avec la sonde pNRS et vont dans le sens de l'existence d'un gène *nia* unique chez la chicorée.

La présence de nombreux fragments génomiques s'hybridant avec pTNG1 pourrait s'expliquer par l'existence d'homologies avec d'autres gènes, notamment ceux codant pour des molybdoprotéines, comme la sulfite oxydase (Crawford *et al.*, 1988) qui pourrait exister en plusieurs copies dans le génome de la chicorée. Un alignement des séquences de la sonde pTNG1 et de la sulfite oxydase d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisé (figure 31) montrant une homologie de 54,5 % entre ces deux séquences.

La sonde pTNG1 étant inutilisable dans notre cas à cause des trop nombreux fragments génomiques avec lesquels elle s'hybride, nous avons décidé de choisir une autre région voisine du promoteur et d'en faire une sonde. Cette sonde, issue de pTNG1, est composée des 181 premiers nucléotides du gène nia (jusqu'au site Spe I) et de 24 nucléotides du site multiple de clonage de pCR1000 (jusqu'au site de coupure Hind III). Nous avons choisi de nous servir de cette sonde afin d'essayer de diminuer les probabilités de s'hybrider avec des gènes comme celui de la sulfite oxydase. En effet, jusqu'au site Spe I (en gras sur la figure 31), il existe une homologie de 53 % avec la sulfite oxydase, mais sur 181 nucléotides au lieu de 54,5 % sur 1018 quand on utilise pTNG1. Cette sonde, I3, de 205 nucléotides, nous a servi pour hybrider de l'ADN génomique après coupure par différentes enzymes de restriction (figure 32). Après les digestions par chaque enzyme de restriction, un seul fragment était attendu. Pour BamH I, le taille attendue devait être supérieure à 795 pb, et le fragment obtenu est d'environ 1750 pb, ce qui laisse supposer l'existence d'un site BamH I à moins de 1000 pb de l'ATG. Nous supposons que le fragment d'environ 1600 pb obtenu avec la sonde pTNG1 correspond à ce fragment de 1750 pb. Pour EcoR I, Pst I et la double digestion Cla I - Sal I, on devait obtenir un fragment de plus de 5387 pb, les fragments obtenus (un par enzyme) sont supérieurs à 12000 pb. Enfin pour Kpn I, le fragment de 3650 pb hybridé peut correspondre à celui attendu supérieur à 1921 pb.

A la vue de ces résultats, le fragment BamH I de 1,75 kb nous a semblé intéressant pour une amplification par PCR-I. En effet, il contient 795 nucléotides du fragment pTNG1 (jusqu'au site BamH I) et environ 960 nucléotides en amont du gène, dans la



*Figure 32:* Autoradiographie des produits de digestion d'ADN génomique de chicorée hybridés avec la sonde I3 et résultats de la taille des produits hybridés.



Figure 33: Représentation schématique de la ligation du fragment BamH I sur lui même. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR sont représentés. Après amplification, la séquence inconnue (celle du promoteur du gène nia) devient interne à une séquence connue (celle de la séquence codante nia). région régulatrice. De plus, la taille de ce fragment se situait parfaitement dans les limites d'amplification définies par une Taq polymérase.

Les résultats de l'hybridation par I3 confirment donc l'existence probable d'un seul gène *nia* chez la chicorée. De plus, du fait de la faible taille de cette sonde, nous diminuons les possibilités d'hybridation avec des séquences telles que celle de la sulfite oxydase. Nous confirmons que l'hybridation de pTNG1 avec de nombreux fragments serait liée aux homologies entre la NR et la sulfite oxydase. Le fait d'utiliser une sonde nucléotidique plus petite permet également de se débarrasser des hybridations hétérologues en augmentant la stringence lors des lavages.

#### I.2. Réalisation de la PCR-I

## I.2.1. Ligature

Après digestion de l'ADN génomique par *Bam*H I, la ligature préférentielle de certains fragments a été réalisée selon l'équation décrite par Dugaiczyk *et al.* (1975) et Collins et Weissman (1984) (cf « Matériel et Méthodes »).

Pour un fragment de 1,75 kb, le facteur « j » est donc estimé à 47,92 µg/mL. Nous nous sommes donc placé dans des conditions où la concentration en ADN était inférieure à 4,792 µg/mL. De telles conditions devaient permettre la circularisation sur eux mêmes des fragments dont la taille est voisine de 1,75 kb.

La ligature est réalisée dans un volume total de 400  $\mu$ L, à 14°C pendant 12 heures (Sambrook *et al.*, 1989), dans les conditions décrites dans la section « Matériel et Méthodes ».

Dans de telles conditions, la région inconnue devient alors interne à la région adjacente (Figure 33). On peut alors réaliser l'amplification par une PCR classique.

#### I.2.2. Amplification par PCR

<u>Choix des oligonucléotides</u>: Des oligonucléotides s'hybridant sur la partie connue, celle du gène *nia* ont été choisis. Le premier (Oligo 6) correspond à la séquence complémentaire de la séquence nucléotidique de +320 à +338 par rapport à l'ATG, et le second (Oligo 5) à la séquence nucléotidique de +397 à +418 (figure 34).



Figure 35: Profil éléctrophorétique de l'ADN amplifié par PCR Inverse.

Le produit amplifié attendu était d'environ 1700 pb, puisque les 60 nucléotides situés entre les deux oligonucléotides ne doivent pas être amplifiés.

$^{\rm 5^{\circ}}$ CCT CTT CAT TAC GTC CGT AAC $\rm C_{3^{\circ}}$	<sup>5'</sup> GGG TGT TTT CCA GTG AGA C <sub>3'</sub>
Oligo 5	Oligo 6

*Figure 34:* Séquence nucléotidique des oligonucléotides choisis pour l'amplification par PCR-I.

Résultat:Après dépôt du produit d'amplification sur geld'agarose, un fragment majeur d'environ 1700 pb était visible (figure 35). Ce fragmentcorrespondait à la taille attendue. Il a donc été prélevé et purifié en vue de son clonage.

#### I.3. Clonage

Le clonage du fragment d'environ 1700 pb a été réalisé avec le kit « TA Cloning » (Invitrogen) dans le plasmide pCR<sup>™</sup>II. La ligature entre le vecteur et l'insert a été effectuée à 14°C pendant une nuit dans les conditions décrites dans la section « Matériel el Méthodes ».

La transformation des bactéries  $INV\alpha F'$  a été réalisée par choc thermique. Les transformants obtenus ont été analysés. Deux clones différents (pTNR1 et pTNR3) ont ainsi été sélectionnés en vue du séquençage.

## I.4. Séquençage

Dans un premier temps, le séquençage du fragment de 1,7 kb a été réalisé selon la méthode de Sanger (1981). Le but était de séquencer une partie des clones obtenus afin de vérifier qu'ils contenaient au moins les deux régions connues et amplifiées de *nia* (régions de 1 à 338 et 397 à 795, par rapport à l'ATG). Si les séquences nucléotidiques aux extrémités des clones correspondent à la séquence *nia* connue, la séquence entre ces deux régions connues devrait être celle du promoteur du gène *nia*.

Au niveau de la première extrémité des clones pTNR1 et pTNR3 (oligo 5), on retrouve une séquence nucléotidique comparable à celle du gène *nia* (figure 36). Quatre différences sont cependant visibles et retrouvées sur chacun des clones par rapport à la séquence

70

codante du gène *nia*. Les séquences nucléotidiques de pTNR1 et pTNR3 étant donc identiques, nous nommerons cette séquence par pTNR.

CCT CTT CAT TAC GTC CGA TAA CCA TGG TCC GGT GCC TAA CGC CAC pTNR CCT CTT CAT TAC GTC CGT TAA CCA TGG TCC GGT GCC TAA CGC CAC nia TINR CTG GGA GGA TTG GAC GGT GGA GAT ATG CGG CTT GGT GAC AAG ACC CTG GGA GGA TTG GAC GGT GGA GAT ATG CGG CTT GGT GAA AAG ACC nia PTNR TGC GCG TTT CAG TAT GAC CCA GCT TGT CAA CGA GTT TCC AAG CAG TGC GCG TTT CAG TAT GAC CCA GCT TGT CAA CGA GTT TCC AAG CAG nia **pTNR** GGA GTT TCC GGT GAC GAT AGT CTG CGC CCG GGA ACC GGG GGA AGG GGA GTT TCC GGT GAC GTT AGT CTG CGC CCG GGA ACC GCC GGA AGG nia pTNR AGC AGA AGC AGA nia

Figure 36: Comparaison entre la séquence nucléotidique de pTNR (ligne supérieure) et celle du gène nia entre +397 et +583 (ligne inférieure). Les différences de nucléotides sont encadrées.

Après séquençage de la deuxième extrémité (oligo 6), on retrouve également une séquence identique à pTNR1 et pTNR3, et qui est identique, à deux différences près, à celle de *nia* (figure 37).

pTNR GGG TGT TTT CCA GTG AGA CGA ACC ATT GAT GGG TTG CGC TCG GGG TGT TTT CCA GTG AGA CGA ACC ATT GAT GGG TTG CGC TCG nia pTNR ATC CAT TGA TCA GCA GTG CCC TGA TCT CTT GGG TCA AAA ACG ATC CAT TGA TOT GCA GTG CCC TGA TCT CTT GGG TCA AAA ACG nia GAG CTT TCC AAC TCG GAG TTC GAC TTT TTA ATG GGG TCA CGA pTNR GAG CTT TCC AAC TCG GAG TTC GAC TTT TTA ATG GCG TCA CGA nia pTNR TAA TC TAA TC nia

Figure 37: Comparaison entre la séquence nucléotidique de pTNR (ligne supérieure) et celle du gène nia entre +338 et +208 (ligne inférieure). Les différences de nucléotides sont encadrées.

Ce premier séquençage nous donne donc à chaque extrémité des clones pTNR1 et pTNR3 des séquences identiques entre elles et quasiment identiques à la séquence du gène de la nitrate réductase de la chicorée. On peut donc envisager, à partir de ce résultat, un séquençage complet des clones afin d'obtenir la séquence comprise entre les deux régions connues.

Le séquençage a été réalisé à l'aide des enzymes Sequenase 2.0 pour le séquençage manuel et SequiTherm<sup>TM</sup> sur séquenceur automatique LI-COR<sup>®</sup> (Epicentre Technologies). Ce séquençage a été réalisé plusieurs fois sur les deux clones pTNR1 et pTNR3.

Les séquences nucléotidiques des deux régions bordant la région inconnue (+397 à +795 et +1 à +338) se sont révélées être identiques à la séquence déjà connue. La séquence de la région supposée promotrice obtenue, contenant 932 pb, est la suivante:

CATCGTGGTT	AAAGAAGAAT	TTTTTCCCTT	TTTTTTCTAAC	TCTGATTGGG
TGAAAGTTTG	TAAACAATGG	ААААТАААСА	TAATTCAGGA	AGATTAAATT
TAAAAACATG	ACTTTTTTAA	TGTCAATGAA	ACTTATTTTC	TAACTTAACT
САТТААААТА	TATGTATTTT	TGCATTAAAT	AAAAATGAAA	CGACTACATA
TAGTTGAACC	ATTAAAATTG	TTATATATTA	AGTTCATTAA	GTGAGAGAAA
ААААААСААА	AAACAGCACC	TTAGACTCTT	CACTTAGAAC	ATAATATATC
TTAAAACACC	TTATTTATAA	GTAATGAATA	TTGACTGTTT	GTGTCTTCCT
CGTAAAGTAA	ATGTGTTTTG	ATTATCCTAA	TATATATAAT	ACTCTAATAC
TCTCAATCTT	AATAATAAGA	GTCTTTTTAT	CAGATATAAT	CTAATAATCC
TTATGTATTT	AGGAGACAAA	ATTTATTTAG	CAGAAAGTTG	AGATGTAATC
TAATACGATC	CAACATATGT	GGCCTCGTCA	ATCTTTGGCC	CCCAAATTTT
GTTTTTATTT	TTTTTCTCTT	TTGTGTTCAA	GTGGATGCAT	CCCCAATGCT
TGCTGTGGCT	CGCTCATTTA	CCTCCTTTTT	CTCCCAAGAG	CTGCTTTAGA
CTCCAAACAC	GTCACTCTCT	TTCACTAAAT	ATATATATTA	AAAAATATAT
GTGGAGATGT	AAATATTTGT	ATTTCGATTA	AATAAACGAC	TCTTTTTACG
TCATCATTTC	TTTATTATAA	AGAAATCGCA	AGATTTTATT	ACTAGTTCAT
AGTTTTCTTG	ATGGTATATA	TATACACACA	CGCATGAGTG	TTCATTAAGG
CAACCTTGTG	TCTCACTTTT	CTCGGCACAG	CAAGCAACAG	GGAAGCTGAC
0330003300		0033003337	on ATChia	
CAACTGAATC	CAAGCTTTTC	CCAACGAAAT	cr-AI Ghia	

Figure 38: Séquence nucléotidique des clones pTNR. Après l'ATG se situe la séquence codante du gène nia de la chicorée.

## II. Analyse du promoteur nia

## II.1. Analyse informatique

### I.1. Alignement de séquences

La séquence pTNR obtenue a été alignée avec les séquences de promoteurs de gènes *nia* contenues dans la banque de données EMBL grâce au logiciel PC/Gene. Il en résulte une homologie avec les séquences suivantes:

Espèce	Cichorium intybus	Nicotiana tabacum 1	Nicotiana tabacum 2	Lycopersicon esculentum	Arabidopsis thaliana	% moyen
Cichorium intybus	-	42.8	44.4	42.4	36.5	41,5
Nicotiana tabacum 1	42.8		80.8	35.2	38.3	38,8
Nicotiana tabacum 2	44.4	80.8		36.1	45.2	41,9
Lycopersicon esculentum	42.4	35.2	36.1	-	47	40,2
Arabidopsis thaliana	36.5	38.3	45.2	47		41,8

Tableau 17 : Tableau présentant les pourcentages d'homologies entre les promoteurs des<br/>gènes nitrate réductase de Cichorium intybus, Nicotiana tabacum 1 et 2<br/>(Vaucheret et al., 1989), Lycopersicon esculentum (Daniel-Vedèle et al.,<br/>1989) et Arabidopsis thaliana (Wilkinson et Crawford, 1993).

tabac1	TCTTTGAGTAATGTA	TACATTTAAGAGCT-	ATATA	TATATATAT	ATGACCCTGCA	ATG	AAGAG	GAAGCTAAC	CTGTTTGCCT
tabac2		TACATACAAGGGCGCGC	<b>GAATAAACTTTT</b>	TTAAAGTAAATGTAI	ATGAACTTGCA	ATG	AAGAG	GACCTTAAC	TTGTTTGTCT
tomate					TACG	ATG	AAA		
petunia	TTTGC1	TATATATATTCGGTT	CGATTCGGTTCGG	TTCAGTATTTTI	TTGATTTTTTT	ATTTTATAAA	AAAAC	TTACCTAAG	TATTCGGTACAG
haricot1		TACTAAAAA		TATATTI	TTTATTTTTT	AGTAGA	AAAAT	AT	TTTTC
chicorée	CATCGTGG1	TAAAGAAGA		ATTTT1	TCCCTTTTTTTTCTAACT	CTGATTGGGTGA	AGTTTGTAAAC	AATGGAAAA	TAAACATAATTC
		-			*	* *	* * *		
tabac1	тастсата паста о	<b>、                                    </b>	<b>™ እ እ እ CCCC እ </b> መመመ	<u> </u>			17 M M A A A C A A A A	C 3 3 M	
tabaci			I AAAAGCCCAIII BA A <i>CACCC</i> CATTI						
tomate			TAACAGCCCAIII	GAGAIIGAII			<u>A</u>		
netunia	ጥጥ <b>ል</b> ጥል ርነል ርጥል ጥጥል እ እ	ACCATCAGTACTCCT		T3 - 3 CTCCTTCCTT	Састасства автесси			<u>_</u>	CCCMACTCGAA-
haricot1		TTGAACG						AT	
chicorée									
CUICOLGE	AGGANGA		** *	10A					CIIIIIIAAI
_		-		^					~ ~ ~
tabac1	GCTTGTGTA	ATT		TGAAGA	ATTTTTTG@	}A		CGTGGT	CGCTGA
tabac2	GCTTGTGTA	ATT		TGAAGA	AAATATTTGG	3A		CGTGCT	CGCTGA
tomate	GTTTTTGTA	ATT		TGA	CT				CTGA
petunia	GTTTTTGTATGCAAG	GCACGCAGATTCAAG	<b>FCTACTTAATTAC</b>	TGCAGATCGATGCGC	AAACTTCAAATTTCTCI	TATATCCTGTGG	TCTTCTTTCTC	ATTCGCCTT	ACCTGACCCACT
haricot1	ATTTTTATA	ATT		A	T	-A			CTAA
chicorée	GTCAATGAAA	CTTATT			TC1	[AA		C-TT	AACTCAT
	* *	* * *			*				** *
tabac1	AAACAG	AGAAA	PACTTTCTGAAAA	GTTGGTCTT	GTTCAAAAACG	TAATAAGAGAGTT	GATTCTTT	TTCGTAA	AAA
tabac2	AAACATTATACI	CCTATATAATAGAAA	TACTTTCTGAAAA	GTTGGTCTT	GTTCAAAAACG	TA-TAAGAGAGTI	GGTCTT	CTCATAA	ATA
tomate	<u>AAA</u>	TAGAAA	CACGACA	CTTAATAGT	GAACG	-GAGAGAGT-		A	AT
petunia	CCCAAA-AA	AGAAA	CGAAAAT	GATATTAAGATTAGT	GGGCCCCTAATAATGC1	TATTATGACCATA	ACTCACTCAAA	ACCACGGCA	АААСААААСААА
haricot1	AAA	TT-TATAA	CATAAAT	TTAAATT	TT	TAGAAAATT	·	A	AT
chicorée	-TAAAATA	TATGTA	TTTTGCATTAAA	T-AAAAAT	 GAAACGAC	TACATATAGTT	GAACCATTA	AA	ATT
	***	*	* *	* *		* * *		*	*
tabad1							Πm		
tabaci				TGATATACCAGGT		ACT-GATA			TAATATITATAC
tomate	CICACIA		CITILICACI	TTCTATATCACGT					TGATATITACAC
petunia			ᡭ᠃᠃᠃᠃᠃᠃᠃᠃᠃᠃᠃					₶₡₡₡₡₡₡₡	
beriget1						AGTACAAT			
	GT m	ATT:				-GTAGAA1	GT		
curcoree	GTT-	ATA		TTCATTAAGTGAGAG		AGCACCTTAGACI	·CT		TCACTTAGAA
	~	•		*		* *	*		***
tabac1	CAAACAAATGAA	AGTAAAATATGTGTGT	CTTTCATACATA	ТАТТТАТСТА	TC-ATAGTTAATGATAI	'ATATA-TATATAT	TTTAACCTTA-	A	ATTTTGACTA
tabac2	CAAACAAATGAA	AATAGGATATGTGTTI	TTCATACGTA	TATTTATCTA	TC-GTACTTAATGATAC	ATACA-TATACAI	AT-AACCTTA-	C'	TTTTTGATTA
tomate	CAACA-		GTA	<b>A</b> TTTA	GTAGTATTTTTC	ATATA-TA		A'	TTTTTGAATAT-
petunia	CTCACAGACCCTGAC	CCTAGCGGCG	TAATGTTTA	AATTCAAAGT	TCTGTAGCTTCTGGCTC	GTTTAATAAAGTI	<b>TTTATCATCAG</b>	<b>GTTAAGATA</b>	ATTTACAAAAGT
haricot1	T-TGAT	GCT	TTATTA(	GAGTCT-CGA	<b>TTTGCTGTATATGTCTC</b>	TAACAACA			TTTAATGAGT
chicorée	CATAATATATCTTAA	AACACCTTA	TTATAAGTA	ATGAATATTGA-CTG	T–––TTGTGTCTTCCTC	GTAAAGTAAATGT		G	-TTTTGATTATC
	*		* * **	* *	*	* *			** * *
tabac1	CTAAAA-TGTAA	TTATATTTAATTTG	GGTAGA-TAT	CAGATGCCAC-T	AAACATTTACCTAG	CCACT			
tabac2	CTAAAAATTTAA	TTATATTTAATTTO	GGTAAA-TAT	CAGATGCCAC-A	AAACATTTACCTAG	CCACTGTTTT	TGACTACTAAA	ATTTAATT	ATGTTTAGCTTG
tomate	CTAAAA	TTTTTAACTTT	GAAAGT-TA-	AC-G	TAACATG	ACA	AAT.		
petunia	ATAAAATTGTCTAAA	GTTAATATAAAATA	AATAGT-TCTAT	GATATACGTTGACTG	TAAAATATGGATTGTTT	GTACCAA	-GATTAATAAT	ACGGGAATT	
haricot1	GTAAAA		GATAGT-G-TAA	GAATTGA			AT.		
chicorée	Стаата		·22720000000000000000000000000000000000	ርጥጥል	─────────────────────────────────────		ат. >т.		
	*** *	* * *	* * *		* *	**	<b>X</b> 1.	<b>n</b>	

tabac1	ATTGAGAAGG-AAATTAGAGTTAGTGGAGCCATAACCTCCGAAAATAAATTGAGAAGG-AAATTAGAGTTAGTGGAGCCATAA	TAATGTTT
tabac2	GGTAAATATCAGATGTCACTAAACATTTTACCTAGCCATTCCTCCGAAAAGAAATTGAGAAGG-AAATTAGAGTTAGTGGAGCCATAA	TAATGTTT
tomate	ATAAATGAGG-AAAAAAATCAATAAATGAGG-AAA	TAAT-TTT
petunia	GTTAATA-ATACGA-AAATTATGTTTAGATATTAAGGGTTT	TTATTTTTATTTTT
haricot1	ATGGAAAAGA-AAAGTTTATACTTAAAGAATATGGAAAAGA-AAAGT	TAAT
chicorée	TAATCTAATAATCTAATAATCCTTATGTATTTAGGAGACAAAATTTATTT	TGTAATCTAA
	** * ** * *** * *	* **
tabac1		3 mmmccma
tabaci	$\lambda = IGI(GCC) A A C C C C A C A C C C C C A C A C C C C C C C C$	
tapacz		ATTIGCTA
		ATTTG
pecunia heminati		AGGATTAGCTT
naricoti		TTTG
chicoree		TTTCTCTTTTGTGT
		** *
tabac1	TTACCCCCAATCCCGCATCTTCCTCTGATCCCGACCCTACGGGCGTAAAAAGTGTAAAATCAT-TAGAATTGT	T-TTATTT
tabac2	TTACCCCCAACATCGCATCTTCCTCTGATCCCGACCCTACGGGCGTAAAAAGTGTAAAATCGT-TAGAATTGT	T-TTATTTAT
tomate	AAAC	TATTATTTTT
petunia	TCCTTGTGCATCCAAACCAAACGACCCCTGATGAAATAAAAACGTTAACAATATGACTCTGTATAAAATTAAAATCCAAATTATGTGGA	GTTTTATTT
haricot1	AAAAAAAAAAAA	<b>T</b> TGTTT
chicorée	ТСААСТССААСТССАТСАТССАТССССААТССТТССТСТСТСССССАТТТАССТССТТТТТСТСССС	AAGAGCTGCTTTAG
	** ** ** ** *	* ***
tabac1	T	GGGTCCC-AC
tabac2	<b>亚亚亚----------------------------------</b>	GGGTCCT-GC
tomate	GCTGATGA-TGTCACA-AACTTTT-GTAATCAAAATTCA-ATTTTGGTGTCGATTTTTT	GGGTCCT-AC
petunia		
haricot1		ACATGGGTT-AG
chicorée	ACTCCAAACACGTCACTCTCTTTCACTAAATATATAT-ATATTAAAAAATATATGTGGGGGGAGATGTAAATATTTGTATTTCGATTAAATAAA	GTCATCAT
	* * * * * * * * * * * * * * * *	тарана таратана тара тар
tabad1		
tabaci		
tomate		CAATAT
pecunia hemiseh1		
naricoti		
curcoree		TAAGGCAACC
		]
tabac1	T <u>C</u> G TTCGAGAGAAATACAGAAAATCTCAATCTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAATATTTTGAGAGAGAAAATACAGAAAATCTCTCT	T-CTT
tabac2	│ Т <u>С</u> С <mark>├</mark> ТТСССАААСАGAACAAGAA ААТСАА АТСТСGG АGAGAGAAA GAGAGAAATATTTTGA GAGAGAAAATACAGAAAATCTCT СТТ	C-CTTCTTTCCTTT
tomate	T <u>C</u> G TTCCAAAACCATACAAAGAACCATCAAAATCTAATTAGAAATCTCTTT	TTCTTCTTCCAAAT
petunia	T <u>C</u> G TTCCCAAACCAAAGAAGAAAACCACATCTAGTGTAGAGAAAATATTGAGAGAGAAAGAGTGAGAGAGAAACGAGGGA-GTTCTCTTCCTT	T-CTTCTTTTATCT
haricot1	TTGCCTTTTTTCCAAACCAACCAACTCACTCACTCA	TTCTAACTCCCT
chicorée	TTGTGTCTGACCAACTGTCACTTTTCTCGGCACAGCAAGCAACAGGGA-AGCTGACCAACTGAATC-CAAGCTT	T
tabac1	TTTTAGAATAATCTATG	
tabac2	TTTTTTCAATCCCCATTCATATTCTTTTTTTTAGAATAATCTATG	
tomate	TCCTCATTCATAATTTTAAAAAAAATCAATG	
petunia	TTTTTTTCCCAAAATCCCCATTATATTTATCCATG	
haricot1	TCTCCTCCCACTCCCTCAATTTCCGCAATG	
chicorée	TCCCAACGAAATCTATG	

Figure 39: Alignement des séquences nucléotidiques des promoteurs de gènes NR chez différents végétaux supérieurs avec celui de la chicorée. Les séquences régulatrices, boîte TATA et site d'initiation de la transcription, sont encadrées. \* : nucléotide parfaitement conservé.

catcgtggtt	aaagaagaat	tttttccctt	tttttctaac	tctgattggg	-793
tgaaagtttg	taaacaatgg	aaaataaaca	taattcagga	a <u>gatta</u> aatt	-743
taaaaaca <mark>tg</mark>	acttttttaa	tgtcaatgaa	ac <mark>ttattttc</mark>	taacttaact	-693
ASF	-1				
<b>ca</b> ttaaaata	<pre>tatgtatttt</pre>	tgcattaaat	aaaaatgaaa	<mark>cg</mark> actacata	-643
			ASF-1		
tagttgaacc	attaaaattg	ttatatatta	agttcattaa	gtgagagaaa	-593
aaaaaacaaa	aaacagcacc	ttagactctt	cacttagaac	ataatatatc	-543
				NIT-	2
ttaaaacacc	ttatttataa	gtaat <u>gaata</u>	t <b>tgac</b> tgttt	g <b>tgtctt</b> cct	-493
			ASF-1	ARF-1	
cgtaaagtaa	atgtgtttt <u>g</u>	attatcctaa	tatatataat	actctaatac	-443
		NIT-2			
tctcaatctt	aataataaga	gtcttttta	tca <u>gata</u> taa	tctaataatc	-393
		NIT-	-2		
cttatgtatt	taggagacaa	aatttattta	gcagaaagtt	gagatgtaat	-343
ctaatacgat	ccaacatatg	tggcctcgtc	aatctttggc	ccccaaattt	-293
tgtttttatt	ttttttctct	tttgtgttca	agtggatgca	tccccaatgc	-243
ttgctgtggc	tcgctcattt	acctcctttt	tctcccaaga	gctgctttag	-193
actccaaac <mark>a</mark>	<b>cgt</b> cactctc	tttcactaaa	tatatatatt	aaaaatata	-143
bZ	iP				
tgtggagatg	taaatatttg	tatttc <u>gatt</u>	aaataaacga	ctcttttt <b>ac</b>	-93
<b>gt</b> catcattt	ctttattata	aagaaatcgc	aagattttat	tactagttca	-43
bZiP				+1	
tagttttctt	gatgg <mark>tatat</mark>	<mark>at</mark> atacacac	acgcatgagt	gt <mark>t</mark> cattaag	+8
gcaaccttgt	gtctcacttt	tctcggcaca	gcaagcaaca	gggaagctga	+58
ccaactgaat	ccaagctttt	cccaacqaaa	tct		+91

Figure 40: Séquence nucléotidique du promoteur du gène de la nitrate réductase chez Cichorium intybus. Les séquences promotrices TATA et site putatif d'initiation de la transcription sont encadrés sur fond jaune. Divers motifs nucléotidiques sont notés: double alignement pour les motifs GATA; couleur verte pour NIT-2; souligné pour les noyaux bZiP; couleur mauve pour ASF-1 et couleur bleue pour ARF-1. La séquence consensus trouvée chez dans les promoteurs des gènes NR et NiR (Hwang et al., 1997) est encadrée sur fond rouge. L'alignement de différentes séquences de promoteurs de gènes codant pour la nitrate réductase de végétaux supérieurs avec la séquence du promoteur de la nitrate réductase de la chicorée révèle des homologies situées principalement au niveau des séquences régulatrices: boîte TATA, site putatif d'initiation de la transcription et site d'initiation de la traduction (figure 39).

Malgré le faible degré d'homologie avec les autres promoteurs de gène *nia*, la technique de PCR-I nous permet de pouvoir supposer qu'il s'agit bien du promoteur du gène *nia* de la chicorée. De faibles pourcentages d'homologies sont généralement trouvés lorsqu'on aligne des promoteurs, même si les séquences codantes sont bien conservées.

#### I.1.2. Séquences régulatrices

La séquence nucléotidique révèle une boîte TATA putative (TATA) centrée sur le nucléotide -26 et une boîte CAAT (CATT) centrée sur le nucléotide -87 (figure 40). Le site putatif d'initiation de la transcription est défini comme le nucléotide +1. Nous avons donc trouvé une disposition classique des différents éléments d'après ce qui est observable chez les promoteurs eucaryotiques. En effet, la boîte TATA est généralement positionnée à 32±7 bases du site d'initiation de la transcription (Joshi, 1987).

#### I.2. Séquences cibles de facteurs de transcription

Dans cette partie, il s'agit d'avoir une idée des facteurs de transcription qui pourraient se fixer sur le promoteur nia de chicorée par l'intermédiaire des homologies de séquences.

Par analyse de la séquence du promoteur du gène *nia* (figure 40), on trouve trois motifs TATC centrés sur les nucléotides -412, -468 et -545, motifs qui correspondent à NIT2 de *Neurospora crassa* (Fu et Marzluf, 1990a). NIT2 est le produit du gène *nit*2, cette protéine est un facteur de transcription impliqué dans le signal de transduction en réponse à la présence de nitrate (Marzluf, 1993).

On peut également observer des séquences consensus des gènes nitrate et nitrite réductases entre les nucléotides –680 à –710, dont le noyau ACTCA est centré sur le nucléotide -693. De telles séquences seraient nécessaires pour la transcription dépendante du nitrate des gènes NR d'*Arabidopsis* (Hwang *et al.*, 1997). Ces motifs, isolés par analyse linker-scanning, sont conservés dans les régions 5' des gènes NiR et NR inductibles par le nitrate (Hwang *et al.*, 1997).

D'autres séquences spécifiques, telles des noyaux (ACGT) pour des facteurs de transcription de type basic-leucine-zipper (bZip) sont trouvées aux positions -182 et -93;

ou un facteur de transcription ARF1 (Ulmasov *et al.*, 1997) qui correspond à un élément de réponse à l'auxine en position -499. ARF1 a été cloné à partir d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant un système de double hybride chez la levure. Les séquences requises pour une liaison avec ARF1 *in vitro* sont identiques à celles qui confèrent la réponse à l'auxine *in vivo* (Ulmasov *et al.*, 1997). Un autre élément peut correspondre à un élément de réponse à l'auxine: ASF-1 (Lam et Lam, 1995) qui est présent en trois exemplaires et centré sur les nucléotides –733, -654 et -509. Cette classe d'élément en *cis* est impliquée dans les phénomènes de réponse à l'auxine et à l'acide salicylique.

On retrouve également des séquences GATA, qui correspondent aux séquences reconnues par les facteurs de transcription de la famille GATA-1, aux positions –113, -407, -471, -515 et –749. La seule protéine susceptible d'être un facteur de transcription impliqué dans la réponse au nitrate chez les végétaux, NITL1, appartient à cette famille (Daniel-Vedèle et Caboche, 1993).

#### **III**. Conclusions

Nous disposions au sein du laboratoire de la séquence codante du gène de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* (Palms *et al.*, 1996). Afin de mener à bien une étude du gène au niveau moléculaire, le clonage et le séquençage du promoteur de ce gène *nia* étaient nécessaires.

La première approche qui consistait en un criblage de la banque génomique de chicorée a échoué du à la présence d'un grand nombre de clones chimériques. Nous nous sommes donc tourné vers la technique de PCR-Inverse qui permet d'isoler une région d'ADN inconnue adjacente à une région connue. Cette technique de PCR-I nous a permis d'isoler un fragment de 932 paires de bases correspondant à une partie du promoteur du gène de la nitrate réductase chez la chicorée. Ce fragment de 932 pb contient des séquences régulatrices telles que la boîte TATA ainsi qu'un site putatif d'initiation de la transcription et révèle une structure commune aux autres promoteurs eucaryotiques. En effet, il a été montré par Joshi (1987) que la boîte TATA est généralement positionnée à 32±7 bases du site d'initiation de la transcription et révoite met 80 et 120 nucléotides du site d'initiation de la traduction.

L'approche de la technique de PCR-I pour le clonage de promoteurs chez les végétaux supérieurs est assez peu répandue, la technique plus classique étant le criblage de banque génomique. On peut se demander si le fait d'isoler des fragments d'ADN par PCR

#### Caractérisation du promoteur nia

n'induit pas des erreurs dues à la Taq Polymérase. En effet, on peut estimer à environ une erreur de réplication imputable à la Taq toutes les 300 paires de bases. On peut donc estimer à environ 3 le nombre d'erreurs dans la séquence amplifiée, ce qui est proche de ce que nous avons obtenu. Cependant, un des avantages de cette technique de PCR-I est de positionner la séquence inconnue de façon interne à la région connue. Ceci permet, outre son amplification, de savoir dès le début du séquençage si la région isolée est bien celle attendue. Quand on essaie d'isoler des séquences de promoteurs c'est un avantage non négligeable compte tenu des faibles taux d'homologies entre les différents promoteurs. Chapitre II: Analyse de la fonctionnalité du promoteur du gène *nia* cloné.



*Figure 41: Représentation schématique de la construction pnia: UidA utilisée pour transformer les cotylédons de Cichorium intybus. Les oligonucléotides U1, U2, N1 et N2 seront utilisés pour tester la présence de la construction dans les transformants.* 

## Analyse de la fonctionnalité du promoteur nia cloné

Afin d'étudier l'activité du promoteur du gène de la nitrate réductase de la chicorée en conditions *in vivo*, l'utilisation de plantes transgèniques, contenant une construction avec un gène rapporteur sous contrôle du promoteur *nia*, a été développée. Le but de cette approche est de déterminer si la séquence isolée est fonctionnelle, et ceci afin de pouvoir commencer les études sur cette séquence.

## A. Etudes sur des plantules Cichorium intybus transformées

Nous avons réalisé la transformation de la chicorée par *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pBI121 dans lequel a été cloné le promoteur du gène de la nitrate réductase de la chicorée (figure 41). Dans cette construction, le gène rapporteur *UidA*-sans intron est donc sous contrôle du promoteur du gène *nia*. Nous pourrons donc étudier l'expression du promoteur en mesurant l'activité  $\beta$ -glucuronidase.

## I. Transformation des explants cotylédonaires de chicorée

Des études menées au laboratoire ont montré que les cotylédons étiolés de 5 jours étaient les explants qui se prêtaient le mieux à la transformation stable de la chicorée (Abid *et al.*, 1995). Après aseptisation des graines de chicorée variété Flash, la germination est effectuée sur milieu Heller 20 (cf Matériel et Méthodes) à l'obscurité pendant 5 jours. Les cotylédons étiolés sont prélevés et lacérés puis sont co-cultivés deux jours sur un milieu contenant 0,1 mg.L-1 de BAP et 100  $\mu$ M d'acétosyringone avec la suspension d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les explants sont ensuite lavés dans la céfotaxime 250  $\mu$ g/mL afin d'éliminer les bactéries et repiqués sur milieu de sélection (cf Matériel et Méthodes) contenant de la BAP, de la cétotaxime mais aussi de la kanamycine afin de sélectionner les transformants. Après 5 jours sur le milieu de sélection, les explants sont repiqués sur le milieu de callogenèse (cf Matériel et Méthodes). Les bourgeons obtenus sont transférés sur milieu d'enracinement. Lorsque les racines sont obtenues, on transfert les plantes en serre.

Plantes F1	Uid A	Npt II
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	1922-192	1. SY <b>-</b> Stat
5	1926-	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	-	+
10	-	+
11	+	+
12	-	+
13	1.1	
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+

Tableau 18:Tableau récapitulatif des tests PCR effectués sur l'ADN génomique des plantes<br/>obtenues après régénération des bourgeons issus de la transformation. Les<br/>PCR sont effectuées avec les amorces N1 et N2 pour le test NptII et U1 et U2<br/>pour le test UidA (cf figure 41). Les signes + et - correspondent,<br/>respectivement, à la présence et à l'absence de produit PCR.



Figure 42: Mesure d'ANR des descendants des transformants primaires pnia-UidA 6,7,8,11,14 et 16, ainsi que des plantes transformées par la construction promoteur 35S:UidA et de la variété sauvage de chicorée Flash. Les plantes ont poussé sur milieu nitrate (en rouge) et ammonium/glutamine (en bleu). Les ANR sont données en nM NO<sub>2</sub> produit/gMF/h.

## II. Etude des plantes transformées pnia-UidA

Nous avons obtenus 17 plantes après régénération. Des extractions d'ADN génomique ont été réalisées sur ces 17 plantes afin d'effectuer des tests de présence des gènes *UidA* et *NptII* par PCR (tableau 18). 11 des 17 plantes (64,7 %) contiennent à la fois les gènes *UidA* et *NptII*. Ces plantes sont cultivées en serre et subissent une période de vernalisation afin de favoriser la floraison. Les inflorescences florales sont récupérées et les graines récoltées. On peut cependant noter que le nombre de graines est très faible pour chaque plante. Dans notre cas la plante ayant donné le plus de graines est la plante n°8 avec 78 graines, alors que la plante n°7 n'a donné que 9 graines et les plantes n°1,2,3,15 et 17 n'en ont donné aucune.

Dans un premier temps, afin de tester l'expression du gène rapporteur *UidA* sous contrôle du promoteur du gène de la nitrate réductase, nous avons fait germer ces graines sur un milieu Heller H20 contenant ou non du nitrate. Comme contrôle de l'expérience, les activités nitrate réductase ont été mesurées (figure 42). On peut remarquer que l'activité NR sur milieu contenant du nitrate est plus forte que sur le milieu ammonium/glutamine (en moyenne 3 fois plus forte). On retrouve donc bien un schéma de régulation attendu, à savoir une activité NR plus forte en présence de nitrate qu'en son absence.

Les activités  $\beta$ -glucuronidases ont été mesurées sur ces mêmes plantes (figure 43). Seule la plante 8 présente une activité  $\beta$ -glucuronidase significative, les autres plantes ne présentant que des activités très faibles. L'expression de l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la plante 8 est 80 plus forte dans les cotylédons en présence de nitrate qu'en absence et 101 fois plus élevée dans les racines en condition nitrate qu'en condition ammonium. L'activité GUS dans les plantes 35S:UidA ne varie pas en fonction de la source d'azote. On peut donc en déduire que l'augmentation d'activité GUS dans les plantes p*nia:UidA* en présence de nitrate, correspond à une augmentation de l'activité du promoteur *nia* du transgène.

On peut également remarquer que l'expression du gène *UidA* dans les racines est trois fois plus forte que dans les cotylédons (6,67 et 2,18 nM MU/min/µg prot) en condition nitrate. Le promoteur *nia* cloné semble donc être plus actif dans les racines que dans les cotylédons en présence de nitrate. Afin de confirmer cette expression, nous avons effectué des tests de localisation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase. Après incubation une nuit dans un tampon contenant du X-gluc, il s'avère que la coloration bleue est localisée dans l'apex racinaire et au niveau des apex des racines latérales. Cette expression se situe donc au niveau de zones à



Figure 43: Mesure d'activité  $\beta$ -glucuronidase dans les cotylédons (C) et les racines (R) des descendants des transformants primaires pnia-UidA 6,7,8,11,14 et 16, ainsi que des plantes transformées par la construction promoteur 35S : UidA et de la variété sauvage de chicorée Flash. Les plantes ont poussé sur milieu nitrate (en rouge) et ammonium/glutamine (en bleu). Les activités  $\beta$ glucuronidase sont données en nM MU/min/µg prot.

forte croissance. Cette localisation rejoint les études effectuées en whole mount au laboratoire (Palms *et al.*, 1996).

La faible proportion de plantes Pnia-UidA montrant une activité  $\beta$ -glucuronidase (1 sur 6) rejoint les résultats des études menées à l'INRA de Versailles. En effet, des constructions contenant des gènes rapporteurs sous contrôle des promoteurs des gènes codant pour la NR de tabac ont été introduites dans des tabacs (Vaucheret et al., 1992). Cependant, les auteurs observent que seulement 20% de ces tabacs transgéniques (22/105) possèdent des niveaux détectables de l'expression du gène rapporteur. De plus, seules 10% des plantes qui ont une activité GUS détectable sont régulées par le nitrate (2/105). L'activité GUS dans les feuilles n'excède pas plus que 2% de celle de feuilles de plantes transformées avec la construction contenant le gène UidA sous contrôle du promoteur 35S (Vaucheret et al., 1992). Des études ultérieures ont montré que l'introduction des transgènes pnia-UidA dans des tabacs a conduit à une inactivation du promoteur du gène nia endogène et de celui contenu dans le transgène pnia-UidA (Vaucheret et Caboche, 1995). Ce phénomène est appelé inactivation génique transcriptionnelle ou « Transcriptional Gene Silencing ». Il peut rendre compte de la très faible expression des transgènes pnia-UidA dans les plantes transgèniques. Dans notre cas, sur 6 plantes pnia: UidA, une seule montre un promoteur nia actif et dont l'activité dépend du nitrate, ceci peut laisser envisager que la fréquence de ce phénomène d'inactivation transcriptionnelle puisse dépendre de l'espèce étudiée.

En conclusion, l'expression d'activité  $\beta$ -glucuronidase de la plante 8 en condition nitrate étant nettement plus élevée par rapport à la condition ammonium / glutamine, confirme la fonctionnalité du promoteur *nia* de chicorée cloné par PCR-I. De plus, la localisation dans des régions de forte croissance de l'expression de cette activité  $\beta$ -glucuronidase, correspond aux résultats des études menées par hybridation *in situ* sur des explants entiers (whole mount) sur l'expression du gène *nia* chez la chicorée (Palms *et al.*, 1996).

Des expériences de Northern blot seraient nécessaires afin de confirmer que l'augmentation d'activité  $\beta$ -glucuronidase corresponde à une augmentation de l'accumulation d'ARNm *UidA*. Cependant, elles n'ont pas été effectuées lors de cette thèse à cause du faible nombre de graines obtenues.

78



*Figure 44: Mesure de l'activité nitrate réductase (en bleu) et de la quantité de nitrate (en rose) de la suspension cellulaire de Cichorium intybus âgée de 7 jours.* 



*Figure 45: Mesure du nombre de cellules (en bleu) et du taux de croissance (en vert) de la suspension cellulaire de* Cichorium intybus âgée de 1 à 14 jours.

# B. Etudes sur une suspension cellulaire de Cichorium intybus transformée

Dans certaines études de l'expression des promoteurs NR, l'utilisation de plantes transgèniques a posé certains problèmes (Vaucheret et Caboche, 1995). Dans notre cas, nous avons obtenu une plante transgènique, mais seulement une, montrant la régulation attendue de la construction p*nia:UidA* par la source azotée. Nous avons donc voulu confirmer la fonctionnalité du promoteur cloné par une autre approche. Pour cela, des essais de transformation transitoire par l'utilisation de protoplastes pourrait être envisagés. Cependant, les mécanismes contrôlant l'expression des gènes NR dans la plante ne semblent pas opérationnels au niveau des protoplastes. En effet, il a été montré que l'expression transitoire du gène *UidA* sous contrôle du promoteur du gène *nia1* de tabac ne reflétait pas la régulation observée dans le tissu duquel les protoplastes dérivaient (Marion-Poll *et al.*, 1984; Vaucheret *et al.*, 1992).

Une autre approche était d'utiliser des feuilles transformées par canon à particules pour effectuer de l'expression transitoire. Des constructions contenant des gènes rapporteurs GUS ou LUC sous contrôle du promoteur du gène NR de la tomate ont été introduites par bombardement de particules dans des feuilles de tabac (Godon *et al.*, 1995). Cependant, ces auteurs n'ont obtenu aucune régulation des gènes rapporteurs sous contrôle du promoteur NR de tomate.

Nous avons donc envisagé une nouvelle approche, basée sur l'utilisation d'une culture cellulaire transformée de façon transitoire. Cette technique permet de pouvoir effectuer un grand nombre de mesures d'activité GUS dans un temps très court et ainsi de pouvoir multiplier les conditions d'expérimentation. Cependant, dans un premier temps il nous a fallu caractériser la suspension cellulaire de chicorée, ainsi qu'étudier son comportement en fonction de la source azotée.

## I. Caractérisation de la suspension cellulaire

La suspension cellulaire a été obtenue par culture de cals initiés à partir d'explants racinaires de *C. intybus* L. var. Witloof (Dubois *et al.*, 1988). Une étude réalisée au laboratoire a montré l'existence d'une NR de la forme NADH:NR dans cette suspension

cellulaire (Chraibi, 1988). Cette culture cellulaire est entretenue sur un milieu contenant du nitrate et des hormones (AIA, 2,4-D et kinétine). L'ANR de cette supsension cellulaire est en partie soumise à un rythme circadien (figure 44). En effet elle est constante pendant une longue partie de la période lumineuse (40 nM NO<sub>2</sub><sup>7</sup>/g MF/h) avec un pic à 60 nM NO<sub>2</sub><sup>7</sup>/g MF/h une heure après le début de l'éclairement et une baisse à environ 20 nM NO<sub>2</sub><sup>7</sup>/g MF/h 15 minutes après la fin de l'éclairement (figure 44). La culture cellulaire est repiquée tous les 15 jours dans un milieu neuf. Une culture qui vient d'être repiquée en milieu neuf est considérée comme âgée de 1 jour. On a mesuré l'évolution du nombre de cellules de la suspension cellulaire venant d'être repiquée dans un milieu neuf (figure 45). Le nombre de cellules augmente de façon constante de 8,2.10<sup>5</sup> au jour 1 à 31.10<sup>5</sup> cellules / mL au jour 15 (figure 45). Cependant, le taux de croissance n'est pas constant. Le taux de croissance est défini comme une variation du nombre de cellules pendant un temps donné. Ce taux de croissance est donc exprimé par un pourcentage par jour.

$$\left(\begin{array}{c} \frac{\text{Nbre Cellules jour b - Nbre Cellules jour a}}{\text{Nbre Cellules jour a}} / (\text{jour b - jour a}) \right) \times 100$$

Entre le jour 1 et le jour 3 il est de 19% par jour, puis il diminue entre le jour 3 et le jour 5 à une valeur de 13% par jour. Le taux de croissance par jour est ensuite constant entre les jours 5 et 10 à 13% par jour. Enfin, le taux de croissance par jour chute considérablement pour atteindre 5% par jour entre le 13 et le 14ème jour. Les cellules sont alors repiquées sur milieu neuf.

## II. Effets du passage d'un milieu nitrate à un milieu ammonium

L'activité nitrate réductase de cette suspension est évaluée entre 80 et 90 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produit/gMF/h dans le mileu de culture classique (7 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Lorsqu'on place la suspension cellulaire dans un milieu où l'ammonium remplace equimolairement le nitrate, on peut alors remarquer que l'activité nitrate réductase chute considérablement dès le premier jour de culture jusqu'au troisième jour puis se stabilise (figure 46). En effet, l'ANR passe de 84 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produit/gMF/h au jour 0 à une valeur de 17 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produit/gMF/h au jour 1, puis diminue jusque 10 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produit/gMF/h à partir du 3<sup>ème</sup> jour.

Analyse de la fonctionnalité du promoteur nia cloné



Figure 46: Evolution de l'activité nitrate réductase d'une suspension cellulaire de Cichorium intybus repiquée au jour 0 dans un milieu ammonium sans nitrate ou dans un milieu avec du nitrate seul.



Figure 47: Analyse des ARNm NR de cellules de chicorée ayant poussé dans un milieu de culture contenant du nitrate à 7 mM puis dans un milieu contenant de l'ammonium 7 mM pendant 0,1,3,4 et 5 jours. A: coloration au BET des ARN totaux (10µg). B: hybridation avec une sonde nitrate réductase (pNRS) marquée au αdCTP<sup>32</sup>.

Cette diminution de l'ANR est associée à une diminution de l'accumulation d'ARNm NR dans les cellules qui subissent le passage du milieu nitrate au milieu ammonium (figure 47).

Nous considérons que 3 jours sur milieu ammonium suffisent pour obtenir une activité nitrate réductase minimale. En effet, on observe une baisse d'ANR de plus de 8 fois lorsque l'on passe d'un milieu contenant 7 mM de nitrate à un milieu contenant 7 mM d'ammonium. De plus, on observe également une forte baisse de l'accumulation des ARNm NR dans les mêmes conditions.



*Figure 48:* Evolution de la quantité de nitrate intracellulaire et de l'ANR de la culture cellulaire de Cichorium intybus lors du passage d'un milieu contenant 7 mM d'ammonium à un milieu contenant 7 mM de nitrate. La quantité de nitrate est exprimée en µg NO<sub>3</sub><sup>-/</sup>gMS. L'ANR est exprimée en nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>produit/gMF/h.

En conclusion à cette expérience, on peut remarquer que les cellules en culture de chicorée ont effectivement une expression de la NR qui dépend du  $NO_3^-$ . Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé (ci-dessous) une expérience d'induction avec du nitrate, de cellules possédant une activité NR minimale (3 jours sur milieu ammonium).

## III. Effets du passage d'un milieu ammonium à un milieu nitrate

Dans les expériences qui suivront, les cellules seront toujours prélevées après 3 jours sur milieu ammonium, afin de se placer dans des conditions d'accumulation d'ARNm NR et d'ANR à leur niveau minimum.

#### III.1. Dosage du nitrate endogène

Lorsque la culture cellulaire est transférée d'un milieu ammonium à un milieu nitrate, on observe une augmentation très rapide de la teneur en nitrate des cellules (figure 48). On passe, en effet, de 17  $\mu$ gNO<sub>3</sub>/gMS lorsque les cellules sont en milieu ammonium à 21,5  $\mu$ gNO<sub>3</sub>/gMS dès les 15 premières minutes en milieu nitrate, ce qui correspond à une augmentation de 27%. La teneur en nitrate augmente fortement jusqu'à 90 minutes pour atteindre 24  $\mu$ gNO<sub>3</sub>/gMS (hausse de 42% par rapport au temps 0). La teneur en nitrate semble ensuite se stabiliser autour de 24  $\mu$ gNO<sub>3</sub>/gMS.

Lors du passage de la culture cellulaire de chicorée d'un milieu ammonium à un milieu nitrate, le nitrate du milieu est rapidement absorbé par les cellules.

#### III.2. Activité nitrate réductase

On peut remarquer sur la figure 48 que l'activité nitrate réductase augmente après un temps de latence de 1 heure. En effet, lors de la deuxième heure on peut voir une activité passer de 12 à 35 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>produit/gMF/h (+191%). L'ANR continue d'augmenter, mais plus lentement, jusqu'à 24 heures après l'induction pour atteindre 86 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>produit/gMF/h (+616% par rapport au temps 0). Il est à noter que les jours suivants l'ANR ne varie plus significativement, elle est en effet de 84 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>produit/gMF/h à 48 heures et 74 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produit/gMF/h à 72 heures.



Temps en heures

Figure 49: Mesure de la quantité relative de protéine nitrate réductase lors du repiquage de la culture cellulaire de Cichorium intybus d'un milieu ammonium à un milieu nitrate en fonction du temps.



Figure 50: Mesure de la quantité de protéines solubles totales lors du repiquage de la culture cellulaire de Cichorium intybus d'un milieu ammonium à un milieu nitrate en fonction du temps.

Δ temps	Coefficient directeur
0 à 60 minutes	- 0,028
60 à 120 minutes	0,39
120 à 180 minutes	0,073
180 à 240 minutes	0,0185

Tableau 19:Coefficients directeurs des segments de droites correspondant à la figure 48.Plus le coefficient directeur est élevé, plus l'ANR augmente rapidement. En<br/>effet, il correspond à l'augmentation d'ANR ramenée à une minute sur la<br/>variation de temps choisie.

La variation d'ANR est plus forte entre la première et la deuxième heure que durant les autres périodes. L'induction de l'ANR commence après l'entrée du nitrate du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire. L'augmentation d'ANR continue ensuite jusqu'à 24 heures mais de façon plus lente.

#### III.3. Quantité de protéine NR

Des tests de mesures de quantités relatives de protéine NR par ELISA ont été réalisés dans les conditions d'induction décrites précédemment (figure 49). Au bout de 90 minutes dans le milieu nitrate, on peut voir la quantité de protéine NR diminuer par rapport au temps 0. Ensuite - aux temps 2, 4 et 24 heures - la quantité relative de protéine NR augmente pour atteindre une valeur de 4,3 fois plus élevée au bout de 24 heures. Il est donc clair que la protéine NR est synthétisée en réponse à la présence de nitrate dans le milieu de culture. Cependant, il est curieux de remarquer une baisse de la quantité de la protéine au bout de 90 minutes alors que l'activité NR augmente à la même période. Le taux de protéines solubles (figure 50) augmentant fortement lors de cette période, on peut penser que la quantité de NR est en fait stable, ou augmente faiblement, mais sa représentation par rapport aux autres protéines baisse. On peut également expliquer l'augmentation de l'activité NR, alors que la quantité de protéine NR est stable, par un mécanisme de déphosphorylation de l'enzyme lors du transfert dans le milieu nitrate. L'enzyme serait présente mais inactive dans le milieu ammonium, elle subirait une déphosphorylation comme première réponse au nitrate puis on verrait une augmentation de sa synthèse pour poursuivre la réponse. Il serait possible de tester cette hypothèse avec une mesure d'ANR en présence d'EDTA comparée à une mesure d'ANR en présence de MgCl<sub>2</sub> et d'ATP.



Figure 53: Evolution du taux d'ARNm nitrate réductase dans une suspension cellulaire de Cichorium intybus lors d'une ré-induction sur milieu nitrate après un passage de 3 jours sur milieu ammonium. L'intensité relative est déterminée sur NIH Image 1.61 par une macro écrite au laboratoire qui permet de calculer la densitomètrie de pistes non droites. Afin d'obtenir la densité relative, on divise la densité d'un spot par la quantité relative d'ARN déposés sur le gel.

#### III.4. ARNm NR

Maintenant que nous avons montré l'induction de l'activité nitrate réductase, il serait intéressant de savoir si il existe une telle induction au niveau de l'accumulation des ARNm. Les extractions d'ARNm ont été effectuées sur des cellules cultivées sur milieu ammonium depuis trois jours (temsp 0), puis aux temps 15, 30, 45, 60 et 90 minutes ainsi que 2, 3, 4, 24, 48 et 72 heures après transfert de la suspension cellulaire dans le milieu contenant du nitrate.



Figure 51: Photographie de gel dénaturant d'agarose à 1,2%. Les ARN, provenant de cellules de chicorée ayant poussé 3 jours sur un milieu ammonium, repiquées ensuite dans un milieu de culture contenant du nitrate, et prélevées à différents temps, sont visibles sous UV par coloration au bromure d'éthidium. On calcule la densité de chaque piste par une macro écrite au laboratoire sur NIH Image 1.61. On établit alors une quantité relative entre chaque échantillon.



Figure 52: Analyse des ARNm de NR de cellules de chicorée ayant poussé 3 jours dans un milieu ammonium, puis repiquées dans un milieu de culture contenant du nitrate et prélevées à différents temps. L'hybridation est réalisée avec une sonde nitrate réductase (pNRS) marquée au  $\alpha dCTP^{32}$ .

D'après les figures 51, 52 et 53, on peut conclure que le taux d'ARNm nitrate réductase augmente dès les 30 premières minutes après repiquage de la suspension cellulaire d'un milieu sans nitrate à un milieu en contenant (de 31 à 292). Ce taux est ensuite stable pendant une heure (≈300) avant d'augmenter fortement après quatre-vingt dix minutes (2259). L'accumulation des ARNm NR est alors à son maximum, puis diminue sensiblement pour

revenir à un niveau très faible quatre heures après repiquage des cellules dans le milieu neuf ( $\approx 150$ ).

Il existe donc une accumulation d'ARNm NR dans les cellules quand la culture cellulaire est transférée d'un milieu ammonium à un milieu nitrate. L'accumulation est à son maximum 90 minutes après le passage des cellules dans le nouveau milieu.

Il existe donc une réponse au nitrate en deux temps. Une augmentation des transcrits NR rapide (30 minutes), puis une deuxième augmentation au bout de 90 minutes. Cette induction en deux temps nous amène à nous demander si le nitrate n'influerait pas sur la stabilisation des ARNm NR dans un premier temps, afin de pouvoir répondre rapidement. Puis la mise en route de la synthèse des ANRm NR pourrait être mise en œuvre plus tard, afin d'augmenter le nombre de transcrits. Les expériences de Northern blot ne suffisent pas pour pouvoir répondre à ces hypothèses. Il faudrait, pour cela, effectuer des expériences de Run-On afin de différencier accumulation des ARNm par stabilité ou par mise en route de la transcription.

## **IV**. Conclusions

Nous avons utilisé, au cours de cette étude, une suspension cellulaire de Cichorium intybus initiée à partir de cals provenant d'explants racinaires. Nous avons montré que lorsque cette culture, qui pousse normalement sur un milieu contenant 7 nM de nitrate, était repiquée de son milieu de culture classique (appelé milieu nitrate) à un milieu ne contenant comme seule source azotée que 7 mM d'ammonium (appelé milieu ammonium), l'activité nitrate réductase baisse dès le premier jour de culture. Cette baisse est accompagnée d'une diminution d'accumulation de transcrits NR. Nous avons ensuite étudié les effets du passage du milieu ammonium au milieu nitrate. Nous avons remarqué une induction de la NR, que cela soit au niveau de l'accumulation de transcrits NR, de l'ANR et de la quantité de protéine NR. Cette induction est précédée d'une entrée très précoce de l'ion nitrate dans les cellules. L'induction transcriptionnelle de la NR par le nitrate est un phénomène connu depuis longtemps (Vincentz et Caboche, 1991;1993). Dans des suspensions cellulaires d'épinard, cette induction avait été montrée par Ogawa et al., 1999. Nous montrons ici que la culture cellulaire de Cichorium intybus est un bon modèle pour l'étude de l'expression de la NR. Il ne semble cependant pas adéquate pour l'étude des effets des hormones sur l'expression de la NR. En effet, la culture a besoin de 54 µM d'ANA, de 90 nM de kinétine et de 90 nM de 2,4-D pour croître dans de bonnes conditions. Les réponses aux hormones étant de plus



Figure 54: Mesure de fluorescence de cellules d'Arabidopsis thaliana transformées p35S:UidA. La courbe indique l'intensité relative de la fluorescence en fonction du nombre de cellules. La zone bleue indique la fluorescence de fond due aux cellules non transformées.



*Figure 56:* Corrélation entre les mesures de fluorescence effectuées en microplaques et l'activité β-glucuronidase mesurée en Eppendorf.

généralement dues à des balances hormonales, il semble aléatoire d'étudier l'effet d'une hormone dans un système déjà très riche en hormones. Enfin, les hormones mettent en jeu des mécanismes qui ne sont pas directes. Elles impliquent une cascade de réactions dans la cellule et il paraît difficile de cibler l'effet sur la NR.

Cette culture cellulaire représentant un modèle classique de réponse au nitrate, nous pouvions donc envisager l'étude de l'expression du transgène pnia:UidA, introduit dans les cellules de chicorée via Agrobacterium tumefaciens.

Nous avons décidé d'effectuer les transformations dans des microplaques de 96 puits afin de pouvoir multiplier les conditions d'expérimentation, mais aussi de pouvoir mesurer assez aisément la fluorescence émise à l'aide d'un lecteur automatique. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser un substrat pour la  $\beta$ -glucuronidase qui soit un chromogène dont le rapport signal/bruit de fond est important, mais aussi que le lecteur soit capable de détecter ce signal. Nous avons choisi le 4-méthyl-umbelliféryl  $\beta$ -D-glucuronide qui, après clivage par la  $\beta$ -glucuronidase, libère le 4-méthyl-umbelliférone, détectable par fluorimétrie. Ainsi, l'ajout direct du fluorochrome en présence de dénaturants puissants (Triton X-100, EDTA,  $\beta$ mercaptoéthanol) permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase dans les cellules végétales.

# V. Mise en place de la technique de détection de l'activité GUS en microplagues

Pour la mise en place de cette technique, nous avons utilisé une suspension cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* transformée de façon stable avec un gène rapporteur *UidA* sous contrôle du promoteur 35S. En effet, nous avons voulu connaître le seuil de détection du fluorimètre. Pour cela, un nombre variable de cellules végétales exprimant de façon stable le gène *UidA* (fournies par B. Dubreucq, INRA Versailles) a été placé dans des puits d'une microplaque. Le test fluorimètrique montre que la fluorescence émise par 10 cellules transformées peut être facilement détectée (figure 54), démontrant ainsi la sensibilité de cette technique de détection de l'activité GUS (Têtu *et al.*, 2000).

Nous avons également pu remarquer que l'absence d'intron dans le gène UidA compromet gravement la détection de la  $\beta$ -glucuronidase des cellules végétales si on veut étudier le



Figure 55: Mise en évidence des cellules d'Arabidopsis thaliana transformées et possédant une activité GUS.
Une suspension cellulaire d'Arabidopsis thaliana a été cultivée en présence d'Agrobacterium tumefaciens pMP90Gin pendant 24 heures. Les cellules ont alors été incubées à 37°C, pendant 2 heures, dans du tampon de réaction MUG et visualisées sous microscope à fluorescence (agrandissement x 200).
a : Cellules d'Arabidopsis thaliana seules

*b* : *Cellules d'*Arabidopsis thaliana *incubées avec* Agrobacterium tumefaciens.

Conditions	-А-	- <i>B</i> -
	Fluorescence	Activité β-glucuronidase
Agrobacterium tumefaciens		
C58C1(pMP90Gin)	$2,34 \pm 2,67$	$0,07 \pm 0,02$
GV3101(pGV3850)	$1,18 \pm 1,05$	$0,08 \pm 0,02$
Arabidopsis thaliana		
Contrôle	$8,02 \pm 1,98$	$0,57 \pm 0,31$
+ C58C1(pMP90Gin)	$16,69 \pm 1,65$	$2,91 \pm 0,41$
+ GV3101(pGV3850)	7,56 ± 2,03	$0,44 \pm 0,30$

Tableau 20: Comparaison des activités β-glucuronidase et de la fluorescence émises par les cellules d'Arabidopsis thaliana incubées 24 heures en présence ou en absence d'Agrobacterium tumefaciens C58C1(pMP90Gin).
-A- Fluorescence des cellules mesurée en micro-plaques par un fluorimètre Labsystems Fluoroskan. Les valeurs sont une moyenne de 1920 puits.
-B- Activité β-glucuronidase mesurée en Eppendorf selon Jefferson et al. (1987) en nM MU produit/min/mg de protéines. Trois mesures de six expériences indépendantes ont été réalisées.
mécanisme de transformation en lui même. En effet, il s'avère que la  $\beta$ -glucuronidase est également exprimée par les bactéries et masque l'expression de l'enzyme par les cellules végétales. Les bactéries ne pouvant pas exciser l'intron, la protéine  $\beta$ -glucuronidase ne sera pas produite dans les bactéries.

Des essais préliminaires ont été réalisés, dans lesquels la culture cellulaire d'Arabidopsis thaliana a été incubée en présence de bactéries détentrices ou non d'un ADN-T porteur du gène UidA-intron (souche pMP90Gin). Après 24 heures de coculture, les cellules ont été placées à 37°C en présence du substrat chromogène. Seules les cellules incubées en présence des agrobactéries UidA-intron présentaient dans leur cytoplasme une fluorescence bleue qui diffuse progressivement dans le tampon d'incubation (figure 55). L'ajout d'une base faible, tel le carbonate de sodium, permet d'intensifier transitoirement la fluorescence du milieu. Cette intensification est une caractéristique physique de la molécule fluorescente d'umbelliférone. Les cellules cultivées en absence d'agrobactéries ou avec des agrobactéries contenant un ADN-T sans le gène UidA (souche GV3101, contenant le plasmide désarmé pGV3850) émettent un niveau de fluorescence faible (tableau 20).

Les cellules qui émettent une fluorescence significativement supérieure à celle des cellules témoins sont donc considérées comme ayant intégré UidA dans le noyau de la notion de seuil de fluorescence permettant de dire que les cellules sont ou non transformées sera étudiée dans le prochain chapitre). Nous avons cependant effectué des mesures d'activité β-glucuronidase afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la fluorescence émise dans les plaques et les activités GUS dans les extraits. Les tests d'activité ont été réalisés selon Jefferson (Jefferson et al., 1987). Les cellules seules ont une activité de 0.57 nM MU produit/min/mg de protéines (tableau 20) alors que les cellules incubées en présence d'agrobactéries pMP90Gin ont une activité de 2,91 nM MU produit/min/mg de protéines. Il est possible de tracer une courbe de corrélation entre la fluorescence émise par les cellules dans les plaques et l'activité  $\beta$ -glucuronidase mesurée en Eppendorf (figure 56), la courbe est tracée avec les valeurs du tableau. La fluorescence en plaque est proportionnelle à l'activité  $\beta$ -glucuronidase avec une courbe de corrélation logarithmique d'équation y = 3,9108 Ln(x) + 11,46 et un coefficient de corrélation de 0,97. La mesure de fluorescence en plaque s'avère donc être une estimation fiable de l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la suspension cellulaire. Grâce à cette technique d'estimation, il est possible de multiplier les expérimentations. Alors que



Figure 57: Mise en évidence des cellules de chicorée transformées pnia: UidA et possédant une activité  $\beta$ -glucuronidase.

Une suspension cellulaire de Cichorium intybus a été cultivée en présence d'Agrobacterium tumefaciens contenant la construction promoteur nia : UidA pendant 24 heures. Les cellules ont alors été incubées à 37°C pendant 2 heures dans un tampon de réaction MUG et visualisées sous microscope à fluorescence (longueurs d'onde d'excitation 334 et 365 nm, filtre barrière 420 nm, Agrandissement x 200).

- A : Cellules de Cichorium intybus seules (T-).
- *B* : *Cellules de* Cichorium intybus *incubées avec* Agrobacterim tumefaciens P*nia*-*UidA* (T+).

pour mesurer l'activité  $\beta$ -glucuronidase selon Jefferson il faut réaliser une extraction protéique puis réaliser la mesure d'activité enzymatique en passant les échantillons un par un dans un fluorimètre et enfin doser les protéines, la mesure de fluorescence en plaque ne demande que très peu de temps et donne une bonne estimation de l'expression de la  $\beta$ glucuronidase. Nous avons utilisé cette technique dans deux conditions, l'une pour étudier le transfert de l'ADN-T des agrobactéries vers les cellules végétales et notamment pour évaluer l'effet de certains composés comme la chloroquine (Têtu *et al.*, 2000; Roszak *et al.*, 2000) et l'autre pour étudier les effets du nitrate sur une suspension cellulaire possédant une construction contenant un gène rapporteur *UidA* sous contrôle du promoteur du gène de la NR de la chicorée, introduite par co-culture avec des agrobactéries.

#### VI. Transformation de la suspension cellulaire de chicorée

Afin d'étudier la régulation du promoteur *nia* cloné en fonction de la source d'azote, nous avons effectué la transformation de la suspension cellulaire de chicorée non transgènique avec la construction contenant le gène rapporteur *UidA* sous contrôle du promoteur *nia* cloné. Nous nommerons par T+ la culture cellulaire ayant été incubée avec *Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction promoteur *nia*:*UidA* et par T- la culture cellulaire de chicorée n'ayant jamais été en contact avec les agrobactéries (figure 57). Le milieu de culture de ces cellules contient toujours du nitrate à 7 mM (cf Matériel et Méthodes).

Un automate nous permet de lire rapidement, par épifluorescence, la fluorescence des différents puits des plaques de microtitration. Une différence significative entre les cellules ayant été en contact avec les agrobactéries ( $32,06 \pm 5,64$  unités de fluorescence) et les cellules qui n'ont pas été en contact ( $9,86 \pm 2,46$ ) a été notée (tableau 21). Une telle différence nous permet de dire que la culture cellulaire T+ est considérée comme transformée. Ces cellules sont transformées car elles ont intégré la construction dans leur noyau mais on ne sait pas si cette construction a pu être intégrée dans le génome.



*Figure 58: Représentation schématique de la distribution des fluorescences corrigées d'une culture cellulaire de Cichorium intybus (histogramme) et de la courbe de distribution de la loi normale centrée réduite (courbe).* 

Analyse de la fonctionnalité du promoteur nia cloné

	<i>T</i> -	<i>T</i> +
Fluorescence moyenne	9,86	32,06
Ecart type	2,46	5,64

Tableau 21:Valeurs moyennes de fluorescence pour la suspension cellulaire de Cichorium<br/>intybus en présence ou non d'Agrobacterium tumefaciens contenant la<br/>construction promoteur nia:UidA. Ces valeurs sont les moyennes de 13<br/>expériences indépendantes de chacune 96 puits.

On peut cependant remarquer que les écarts types ne sont pas négligeables. En effet, les valeurs de fluorescence varient d'une expérience à l'autre en fonction de la quantité de cellules, du nombre de bactéries, mais surtout de l'état physiologique des cellules végétales. Pour cela, afin d'harmoniser les résultats des différents essais, nous avons divisé les valeurs de fluorescence par la valeur moyenne de fluorescence des cellules non transformées. Avec de telles valeurs corrigées, on s'affranchit des variations liées à l'état physiologique, ou aux paramètres tels que le nombre de cellules ou de bactéries. Des courbes de répartition de la fluorescence des cellules transformées ou non peuvent alors être tracées.

De telles courbes permettent d'établir qu'il existe une variation de la fluorescence dans les puits contenant des agrobactéries ajoutées aux cellules végétales par rapport aux puits témoins, ne contenant que des cellules de chicorée. Le but de construire de telles courbes était de pouvoir estimer la proportion de cellules transformées. Pour cela nous avons observé une loi statistique. La courbe de distribution de fluorescence corrigée des cellules de chicorée a été comparée à la distribution de la loi centrée normale réduite. Les deux distributions montrant des similitudes, nous voulions calculer si la distribution des valeurs corrigées de fluorescence suivait cette loi normale. Afin de parfaire l'analyse, les valeurs de la courbe de distribution ont été traitées de façon à obtenir une courbe de distribution centrée réduite :

$$z = \frac{f_c - \bar{f}_{T-}}{\sigma_{T-}}$$

où

 $f_{e}$  est la valeur de fluorescence corrigée

 $f_{_{T^-}}$  est la moyenne des valeurs de fluorescence corrigées des cellules de chicorée seules

 $\sigma_{\tau_{-}}$  est l'écart type des valeurs de fluorescence corrigées des cellules de chicorée seules



*Figure 59: Répartition des effectifs pour la suspension cellulaire de chicorée n'ayant pas été en contact avec les agrobactéries (T-) et celle ayant été transforméespar* Agrobacterium tumefaciens contenant la construction gène UidA sous contrôle du promoteur du gène de la NR de chicorée (T+).

Un calcul du  $\chi^2$  (tableau 22) a permis d'établir que la courbe de distribution des fluorescences corrigées n'était pas significativement différente de la distribution de la loi normale (figure 58).

Classe	< -1,5	[-1,5;-1[	[-1;-0,5[	[-0,5;0[	[0;0,5[	[0,5;1[	[1;1,5[	> 1,5
Effectif observé	104	158	253	294	282	209	125	108
P(x)	0,067	0,092	0,149	0,192	0,192	0,149	0,092	0,067
Effectif théorique	102,711	141,036	228,417	294,336	294,336	228,417	141,036	102,711
$\chi^2$	0,0161	2,040	2,645	0,0003	0,517	1,650	1,823	0,272
$\chi^2$ total	Le $\chi^2$ est d	le 8,966. Po	our un ddl d	e 5, avec 59	$\%$ , le $\chi^2$ ma	x. est de 11	,07. H <sub>0</sub> n'es	t pas rejetée.

Tableau 22:Calcul du  $\chi^2$  pour la suspension cellulaire de Cichorium intybus. L'hypothèse<br/> $H_0$  est « la distribution des valeurs de fluorescence de la suspension cellulaire<br/>de chicorée suit une loi normale centrée réduite ». Après calcul le  $\chi^2$  est de<br/>8,966. Pour un degré de liberté (ddl) de 5, avec un intervalle de confiance de<br/>5%, le  $\chi^2$  maximum doit être de 11,07. Donc l'hypothèse  $H_0$  n'est pas rejetée.<br/>La distribution des valeurs de fluorescence suit une loi normale centrée réduite<br/>avec un intervalle de confiance de 5%.

Dans le cas d'une loi normale centrée réduite, on peut, à l'aide d'une table statistique, déterminer la proportion d'échantillon qui dépassent une valeur fixée. Ainsi, si on désire se situer de façon à avoir 99% d'échantillons en-dessous d'une certaine valeur, la table nous indique que cette valeur est égale à 2,326. Ainsi, pour les cellules témoins de *Cichorium intybus* (non transformées), on a 99% des puits dont la fluorescence z est inférieure à 2,326. C'est à dire que 99% des puits ont une fluorescence  $f_c$  inférieure à  $\bar{f}_{T-}$  + 2,326 $\sigma_{T-}$ . En conséquence, seuls 1% des puits ont une valeur supérieure à la valeur seuil. Au-dessus de cette valeur, les puits pourront être considérés comme positifs, c'est à dire contenant des cellules transformées. Ceci n'est valable que si nous acceptons de prendre un risque d'erreur égal à 1%.

La même démarche, appliquée aux cellules de chicorée ayant été incubées en présence d'agrobactéries, permet de dire que 79 % des puits dépassent la valeur limite au risque de 1% (figure 59). On peut cependant remarquer trois groupes d'histogrammes pour la distribution des effectifs T+ (cellules végétales en présence de la construction p*nia:UidA*). Un de ces groupes se situe au niveau des classes [-0,5 ;0[ à [1 ;1,5[, c'est à dire dans des valeurs qui représentent la distribution des effectifs T-. Ce groupe d'histogrammes représentent la part de puits non positifs bien que les cellules végétales présentes aient été incubées en présence d'agrobactéries. Les deux autres groupes sont centrés respectivement autours des classes [4 ;4,5[ et [5 ,5 ;6[. Ces deux groupes représentent la part des puits positifs, c'est à dire contenant des cellules transformées.

Notre technique permet donc de distinguer les puits contenant des cellules transformées de ceux contenant les cellules non transformées. Cependant, pouvons-nous déduire un taux de transformation à partir du taux de puits positifs ? Le taux de transformation est le nombre de cellules exprimant le gène *Uid*A au sein d'une population donnée. Chaque puits peut être considéré comme une population à part entière contenant un certain nombre de cellules transformées et non transformées. Nous ne prétendons pas établir un taux de transformées au sein d'un puits et de donner une bonne approche de l'expression  $\beta$ -glucuronidase par la mesure de fluorescence émise dans les puits.

Nous avons de plus comparé le pourcentage de puits positifs avec le pourcentage de transformation défini par la proportion de cellules exprimant effectivement *UidA* au sein d'une population. Ce pourcentage de transformation a été vérifié par l'observation de cellules au microscope à fluorescence. Les conditions de co-culture bactéries / cellules végétales ont été réalisées de façon identique à la technique utilisant les microplaques. Certaines cellules présentaient une fluorescence cytoplasmique due à l'expression de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase. Leur représentation relative au sein de la population de cellules a été établie par comptage en cellule de Nageotte. Ces cellules représentent 80 % (± 5%) du nombre total des cellules de la suspension. Il apparaît ainsi que le pourcentage de cellules émettant une fluorescence s'approche du taux de puits positifs. Il est donc probable que cette technique fournisse une bonne estimation du taux de cellules transformées.

## VII. Influence de la source azotée sur la suspension cellulaire de chicorée transformée

Afin d'étudier l'expression du promoteur *nia* cloné en fonction de la source d'azote, la suspension cellulaire de *Cichorium intybus* transformée par des agrobactéries contenant la construction p*nia:Uid*A a été placée dans un milieu contenant ou non du nitrate. Les mesures d'activités GUS ont été effectuées selon la technique décrite précédemment.

Les valeurs de fluorescence des puits ont été réparties selon la courbe de distribution des fluorescences corrigées (figure 60 a et b). Il apparaît que le taux de puits positifs, comparé à la



*Figure 60: Répartition des effectifs de la suspension cellulaire de chicorée transformée par pnia:UidA ayant poussé sur milieu ammonium pendant 7 jours puis repiquée sur un milieu nitrate (en rouge) ou un milieu ammonium (en bleu) pendant 4 jours. a : distribution de T+ NO<sub>3</sub> et T+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> par rapport au témoin. b : distribution de NO<sub>3</sub> par rapport à NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.* 

répartition des cellules non transformées de chicorée, est de 68 % pour les cellules transformées en milieu ammonium (T+  $NH_4^+$ ) et 100 % pour les cellules transformées en milieu nitrate (T+  $NO_3^-$ ) (figure 60a). Il apparaît donc clairement que l'activité GUS de la culture cellulaire transformée est différente selon la source azotée. Quand on compare les distributions des cellules transformées et repiquées en milieu nitrate par rapport aux cellules transformées et repiquées en milieu ammonium, on observe (figure 60b) que 11% des puits en condition  $NO_3^-$  sont significativement supérieurs, à 1% d'erreur, aux puits de la condition  $NH_4^+$ .

Les résultats obtenus ici confirment l'inductibilité du promoteur *nia* cloné. Cependant, ils ne sont pas complètement satisfaisants dans la mesure où les distributions des valeurs corrigées de la culture cellulaire transformée par p*nia*:*UidA* sont relativement proches entre la condition nitrate et la condition ammonium.

Quand on compare les distributions de valeurs corrigées des figures 60a et 60b, on remarque des répartitions de classes différentes pour une même condition. Ceci est du au fait que l'on divise les valeurs de fluorescence par la valeur moyenne de fluorescence du témoin. Or, les témoins différent entre la figure 60a (T-) et la figure 60b (T+ $NH_4^+$ ).

Il s'agit ici d'une première expérience, il faudra réaliser de nouveaux essais sur la suspension cellulaire afin de confirmer ces résultats. Il serait ensuite intéressant de pouvoir réaliser des tests d'analyses de délétions du promoteur dans le but de localiser des régions impliquées dans la réponse au nitrate.

Chapitre III: Recherche de protéines pouvant interagir avec le promoteur du gène nia de la chicorée.



Figure 61: Coloration argentique de protéines tissulaires solubles de chicorée ayant poussé sur un milieu nitrate ou un milieu ammonium. Les carrés jaunes indiquent les protéines dont l'accumulation est plus forte en condition ammonium. Les carrés rouges celles dont l'accumulation est plus forte en condition nitrate.



Chez les plantes, la caractérisation de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de la NR (et d'autres enzymes comme la NiR) par la source d'azote, reste un enjeu important pour la compréhension des mécanismes moléculaires de cette régulation. Afin de caractériser des protéines (facteurs de transcription potentiels) pouvant interagir avec le promoteur *nia* de *Cichorium intybus*, deux approches ont été entreprises. Dans un premier temps nous montrerons la caractérisation de protéines extraites de la suspension cellulaire cultivée sur deux conditions azotées différentes, puis nous présenterons des expériences de retard sur gel.

Dans ce chapitre, nous allons comparer des protéines extraites de cellules ayant poussé sur milieu nitrate ou sur milieu ammonium dans le but d'isoler des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du gène *nia*. Nous baserons notre étude sur des différences d'accumulation des protéines. Nous formulons donc le postulat que les facteurs de transcription recherchés soient également accumulés de façon différentielle en fonction de la source d'azote. Ce postulat sera discuté en conclusion de la première partie de ce chapitre.

### I. Caractérisation de protéines accumulées de façon différentielle dans une suspension cellulaire de *Cichorium intybus* cultivée sur un milieu NH4<sup>+</sup> et un milieu NO3<sup>-</sup>

#### I.1. Protéines tissulaires solubles

Des extractions de protéines tissulaires de cellules provenant de la suspension cellulaire de *Cichorium intybus* L. ont été réalisées sur des cellules ayant poussé 3 jours sur milieu ammonium puis repiquées pendant 90 minutes sur un milieu contenant ou non du nitrate. Ces protéines ( $80 \mu g$ ) ont été ensuite soumises à des migrations 2D. Il n'existe aucune différence au point de vue qualitatif (figure 61). En effet, les protéines sont toutes présentes dans les deux conditions. Par contre, après analyse des

Désignation du	Intensité	Intensité	Coefficient	N° du spot	Intensité	Intensité	Coefficient
spot protéique	NO <sub>3</sub> -	NH4 <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub>	( <i>NH₄NO</i> <sub>3</sub> )	NH4 <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub>	NH4/NO3
a	3.800	1.258	3.02	h	10.350	2.306	4.49
b	1.763	0.263	6.70	i	4.374	1.605	2.72
С	2.266	0.373	6.07	j	5.532	3.343	1.65
d	3.252	0.332	9.79				
e	3.397	1.299	2.61				
f	12.234	1.435	8.52				
g	9.381	5.275	1.78				

gels par le logiciel SOLARIS sur station SUN, on peut remarquer des différences d'intensité des spots protéiques (tableau 23).

Tableau 23:Intensité des spots protéiques en condition nitrate et ammonium. Dans la<br/>partie gauche du tableau figurent les intensités des protéines dont<br/>l'accumulation est plus forte en milieu nitrate, dans la partie droite celles<br/>dont l'accumulation est plus forte en milieu ammonium. Les intensités sont<br/>calculées par le logiciel 2-D Analyser sur SOLARIS.

Dans la condition nitrate, on remarque donc 7 spots protéiques dont l'accumulation est plus forte qu'en condition ammonium. On dénombre également 3 spots protéiques dont l'accumulation est plus élevée en condition ammonium qu'en condition nitrate. La protéine « f » présente une différence d'accumulation très importante entre la condition nitrate et la condition ammonium. On peut estimer sa taille à environ 100-110 kDa et son pHi à environ 5,5-6. Ces caractéristiques peuvent correspondre à la sous unité de la protéine NR. En effet, sous www.exspasy.ch, la masse moléculaire de la NR de chicorée peut être estimée à partir de la séquence en acides aminés à 103519 Da et son point isoélectrique à 6.21. Le spot « f » semble donc correspondre à ces caractéristiques.

En conclusion, on peut donc remarquer qu'il n'existe aucune protéine tissulaire soluble dont la présence obéisse à la loi du « tout ou rien » en fonction de la source azotée dans nos conditions d'extraction protéique. Il n'existe que des protéines dont l'accumulation varie selon la nutrition azotée.

Parmi les protéines tissulaires solubles, on retrouve des protéines pariétales, des protéines cytoplasmiques, ou des protéines nucléaires. On peut estimer à plus de 900 les spots protéiques présents sur les gels bi-dimensionnels que nous avons obtenus. Partant du fait que nous voulions tenter d'isoler des facteurs de transcription, qui sont localisés dans le noyau, et du fait qu'avec les protéines tissulaires solubles nous n'observions pas de



Figure 62: Coloration argentique de protéines nucléaires de chicorée ayant poussé sur un milieu nitrate ou un milieu ammonium. Les cercles entourent des protéines existant dans les deux conditions afin de se repérer. Les rectangles rouges soulignent des régions qui seront étudiées par la suite.



Condition nitrate



Condition ammonium



Composite

Figure 63: Agrandissement de la région I de la figure 62. Les protéines de référence sont entourées et annotée de a à h. Les protéines d'intérêt sont encadrées, en rouge pour celles qui sont accumulées plus fortement en condition nitrate et en jaune pour celles retrouvées uniquement dans une des deux conditions.



Condition nitrate



Condition ammonium



Composite

Figure 64: Agrandissement de la région II de la figure 62. Les protéines de référence sont entourées et annotée de i à k. La protéine d'intérêt est encadrée en rouge. Elle présente une accumulation plus forte en condition nitrate qu'en condition ammonium. différences marquées, il nous a semblé intéressant d'extraire les protéines nucléaires plutôt que les protéines tissulaires solubles. De plus, le nombre de protéines étant plus faible (estimé à 300 sur les gels bi-dimensionnels), peut-être verrions-nous plus nettement les différences.

#### I.2. Protéines nucléaires

Des extractions de protéines nucléaires ont été réalisées sur des cellules ayant poussé dans les mêmes conditions que pour les extractions des protéines tissulaires. Ces protéines ( $80 \mu g$ ) ont également été soumises à des migrations 2D. Contrairement aux protéines tissulaires, il existe de nombreuses différences entre les deux conditions, que cela soit au niveau quantitatif ou qualitatif. La figure 62 représente les gels dans leur ensemble. Certaines protéines, communes aux deux conditions, sont entourées et servent de points de repère sur les gels. Deux zones ont été encadrées, elles renferment des protéines exprimées de façon différentielle dans les cellules cultivées sur milieu NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et sur milieu NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Dans la zone I (figure 63), deux protéines sont présentes aussi bien dans la condition nitrate que dans la condition ammonium. Ces protéines ont été numérotées 4 et 5. L'intensité de ces spots protéiques est plus élevée dans la condition nitrate que dans la condition ammonium. L'intensité du spot 4 est de 7,534 en condition nitrate et de 0,639 en condition ammonium. Pour le spot 5, ces intensités sont de 12,310 et de 0,502 en condition nitrate et ammonium, respectivement. On peut également remarquer, dans cette zone, une protéine qui n'est présente que dans la condition nitrate (n°2, avec une intensité de 2,366) et une présente uniquement dans la condition ammonium (n°1, avec une intensité de 4,386). On peut remarquer sur la composite, que ces deux protéines sont relativement proches l'une de l'autre. La composite est la somme des deux gels réalisée par le logiciel 2D Analyser sur station SUN sous SOLARIS. On retrouve ainsi sur une composite les spots protéiques existant dans les deux conditions mais aussi ceux spécifiques de chaque condition. Une composite permet donc de pouvoir positionner artificiellement sur une image les protéines présentes sur deux gels différents. Ces 4 spots ont été découpés afin de réaliser leurs spectres en spectrométrie de masse puis un séquençage par nano-spray (cf Matériel et Méthodes).

Dans la zone II (figure 64), on remarque une protéine ( $n^{\circ}3$ ) dont l'accumulation est plus forte en condition nitrate qu'en condition ammonium, les intensités respectives étant de

<b>Protéine n°</b>	Protéine ayant des homologies de spectre	% d'homologies	Masse moléculaire / pI N° d'accès
1	HAPp48,5 Arabidopsis thaliana	100% (8/8)	48518.8 / 4.60 Y09562
1	Protéine inconnue Arabidopsis thaliana	100% (8/8)	47066.6 / 4.93 AC003027
1	Protéine inconnue Arabidopsis thaliana	87% (7/8)	49633.8 / 4.90 AC004005
2	nifA Klebsiella pneumoniae	100 % (11/11)	58632.5 / 6.53 X13303
2	nifA Klebsiella oxytoca	100% (11/11)	58650.5 / 6.67 D00339
2	hypothétique nifA Klebsiella pneumoniae	100% (11/11)	54064.9 / 6.00 X02616
2	NR(I) Escherichia coli	82 % (9/11)	52255.0 / 6.05 P06713
3	FIN21.17 protéine inconnue Arabidopsis thaliana	100% (9/9)	125827.0 / 5.23 AC002130
3	Protéine putative Arabidopsis thaliana	100% (9/9)	120436.0 / 4.94 AL61547
3	Protéine inconnue Arabidopsis thaliana	100% (9/9)	116660.6 / 5.33 AC004697
3	ORF YKL015w Zinc-finger Facteur de transcription Saccharomyces cerevisiae	100% (9/9)	111415.0 / 5.23 Z28015
3	Spt5p Facteur de transcription Saccharomyces cerevisiae	100% (9/9)	115650.3 / 5.09 Z49810
4	N-utilization protein A Borrelia burgdorferi	100% (7/7)	54817.0 / 4.82 AF113597
4	N-utilization protein A Neisseria meningitidis	100% (7/7)	55752.1 / 4.54 AE002514
4	N-utilization protein A Neisseria meningitidis	100% (7/7)	56418.9 / 4.55 AL162757
4	ntrA Azospirillum brasilense	85% (6/7)	57764.6 / 4.94 X84991
5	Putative protein Arabidopsis thaliana	100% (8/8)	51671.5 / 6.19 AL161550
5	Protein kinase-like protein Arabidopsis thaliana	100% (8/8)	48174.2 / 5.80 AL61549
5	Putative protein Arabidopsis thaliana	100% (8/8)	54495.4 / 6.24 AC004697
5	Protéine inconnue Arabidopsis thaliana	100% (8/8)	50837.4 / 6.18 AC006920

Tableau 25:Tableau récapitulatif des résultats obtenus lorsque les spectres de masse des 5<br/>protéines nucléaires sont soumis sur le site http://www.prospector.uscf.edu au<br/>logiciel MS-Fit. Le pourcentage d'homologie représente le pourcentage de<br/>peptides du spectre de masse qui sont retrouvés dans le spectre de masse de<br/>protéines connues.

7,724 et 0,686. Ce spot a également été découpé afin de les analyser en spectrométrie de masse.

Les 5 spots protéiques prélevés ont été soumis à une digestion trypsique puis une analyse en spectrométrie de masse. Les spectres de masse obtenus sont présentés dans le tableau 24, ci dessous.

Spots protéiques	Masse moléculaire	pHi	Masse a	les peptide	es obtenu	<b>S</b>
1	55 000 – 60 000 Da	6,5 - 7	1127,7	1428,6	1476,9	1803,8
			1941,8	2190,8	2438,3	2567,4
2	55 000 – 60 000 Da	6,5 – 7	1067,4	1127,1	1278,3	1366,5
			1428,3	1476,7	1606,3	1804,7
			1941,7	2239,2	2564,5	
3	120 000 Da	5	842,9	1127,1	1317,4	1425,5
			1505,5	1803,4	1941,3	1987,9
			2239,9			
4	55 000 – 60 000 Da	4,5	1127,7	1275,6 1	425,7 14	77,1
			1804,3	1942,4 2	240,5	
5	45 000 – 50 000 Da	6	843,1	1127,7	1426,3	1477,0
			1805,3	1942,2	2241,0	2566,6

Tableau 24: Tableau récapitulatif des spectres de masse des 5 protéines nucléaires prélevées.

Il est possible de soumettre ces résultats de spectres de masse contre des bases de données de protéines afin de chercher un profil connu. Les spectres de masse sont soumis sous http://www.prospector.ucsf.edu, dans le logiciel MS-Fit. Il est alors possible d'obtenir des homologies de masse avec des protéines connues. Cependant, ces résultats ne sont qu'informatifs, en effet nous ne soumettons en fait qu'un faible nombre de masses peptidiques. De plus, les banques de données ne donnent que des homologies de masse avec des protéines connues. Or, dans le domaine végétal, ou même dans le domaine fongique, ces bases de données ne contiennent que très peu d'informations. Le tableau 25 montre les protéines trouvées lorsqu'on soumet les profils de masse des 5 peptides au site http://www.prospector.ucsf.edu. On peut remarquer que la protéine 1

présente des homologies de spectre de masses avec des protéines qui ont été isolées chez *Arabidopsis thaliana*, mais dont le rôle est inconnu.

La protéine 2 ne présente d'homologies qu'avec des protéines du règne bactérien, principalement avec la protéine nifA. Le spectre de masse de la protéine 2 n'a aucune homologie avec des protéines issues d'Arabidopsis thaliana ou de Brassica napus, deux des seuls végétaux présents dans les banques de données. NifA est un gène qui code pour un activateur de transcription et intervient, selon les espèces, dans des conditions physiologiques différentes telles la réponse à l'oxygène, à l'ammonium ou encore au nitrate. Ce gène contrôle l'expression des autres gènes nif, qui sont regroupés en 8 opérons. L'activation par *nifA* requiert un facteur  $\sigma^{54}$  (Kustu *et al.*, 1989), dont la partie C-terminale contient un motif de liaison à l'ADN qui est très conservé. Les promoteurs des opérons nif sont précédés par plusieurs séquences dont le noyau consensus est TGT-N<sub>10</sub>-ACA, appelé UAS (Upstream Activator Sequence) et qui correspond au site de fixation de nifA. La fixation d'une troisième protéine IHF (Integration Host Factor) entre la région UAS et la région du promoteur -12/-24 favorise la formation d'une boucle entre la région UAS et celle du promoteur, permettant à NifA d'entrer en contact avec le complexe ARN polymérase –  $\sigma^{54}$  pour la formation du complexe de transcription ouvert (Santero *et al.*, 1990). Le produit de traduction du gène nifA est formé de plusieurs domaines. Le domaine N-terminal est très peu conservé, il est d'ailleurs absent chez certaines souches bactériennes. La partie C-terminale porte le site de liaison à l'ADN (pour revue: Elmerich, 1997).

La protéine 3 donne avec *Arabidopsis thaliana* le même type de réponses que la protéine 1, à savoir des protéines isolées mais dont le rôle demeure inconnu. Par contre, cette protéine 3 donne des homologies avec des facteurs de transcription caractérisés chez les levures.

La protéine 4 présente des homologies de spectre avec une protéine du règne bactérien, chez *Neisseria meningitidis* et *Borrelia burgdorferi*. Cette protéine, nommée N-utilisation protéine A, est impliquée dans la réponse au nitrate (Tettelin *et al.*, 2000).

Pour obtenir plus d'informations, quant à la nature des 5 protéines prélevées, il serait nécessaire de les soumettre à un séquençage.

Seules les protéines 1 et 2, spécifiques respectivement des conditions ammonium et nitrate, ont été soumises à un micro-séquençage par nano-spray. Les trois autres le seront ultérieurement.

Masse du parent	Masse des peptides encadrant	Séquence	
563	710,6 – 936,9	Ala – Gly – II L	sp le eu
610	548.2 - 923,5	Ile - Asp – Ph Leu	ie
610	714,2 - 940,6	Asn Ile - Leu Asp	

Tableau 26:Tableau récapitulatif du micro-séquençage par nano-spray de la protéine 1. Le<br/>parent est le peptide qui est séquencé.

Masse du parent	Masse des peptides Séquence						
	encadrant						
602,8	690 – 1061,7		Asp	)			
		Ala –	-	- 1	Asp - A	la	
			Ası	n			
634	743 – 1164,6		Glu				
		Asp -		-	Ala - A	sn	
			Gln				
680	773,1 – 1129,9	Gln		e			
			-		- Asp		
		Glu		eu			
763	843,3 – 1084,8	Gln		e			
		Glu		eu			
763	953,9 – 1393,7	Ile			Ile	Ile	
		Leu	- Va	վ -	-		
		Asp			Leu	Lei	u
763	754,8 – 1298,6			[]	le		Asp
		Ser –	Glu -	-	- 7	Val -	
					Leu		Asn
772	774,4 – 1297	Asp			Ile		
			- Gl	u -	-	Val ·	- Pro
		Asn			Leu		
971	991 - 1696,1				As	n	
		Ala –	Ser -	- S	er -	- C	ln – Glu - Phe
					As	р	

Tableau 27:Tableau récapitulatif du micro-séquençage par nano-spray de la protéine 2. Le<br/>parent est le peptide qui est séquencé.

Pour la protéine 1, il a été possible de déterminer 3 micro-séquences (tableau 26). Pour chaque séquence, on donne le parent, c'est à dire la masse du peptide séquencé ainsi que la masse des peptides encadrant. Cependant, ces 3 micro-séquences sont insuffisantes pour pouvoir les soumettre aux banques de données. En effet, elles ne sont composées que de 2 à 3 acides aminés. Ces motifs ne sont donc pas assez longs pour pouvoir les soumettre à une analyse fiable.

Pour la protéine 2, nous avons pu mettre en évidence 8 micro-séquences (tableau 27). Les micro-séquences ont été soumises sous le serveur www.expasy.ch aux logiciels PROWL ou TagIdent, il en résulte de nombreuses homologies avec des protéines existantes, quel que soit le règne concerné. Cependant, on peut regretter l'absence des champignons filamenteux tels *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa* de ces banques de données. En effet, chez ces deux espèces, on connaît les facteurs de transcription AREA et NIT2 impliqués dans la réponse au nitrate. Cependant, on peut remarquer que nous obtenons de nombreuses réponses dans le règne bactérien, où il existe de nombreuses protéines impliquées dans la réponse au nitrate. Et notamment, une qui est toujours retrouvée dans les réponses, NARQ d'Escherichia coli. NARQ est une protéine de 566 acides aminés et qui a une masse moléculaire de 63696 Da. Elle agit comme un senseur de la présence de nitrate et de nitrite, et elle intervient dans la transduction du signal en activant probablement NARL et NARP par phosphorylation. Parmi les 8 séquences obtenues avec la protéine 2, 7 sont retrouvées dans la séquence de NARQ (figure 65)

Curieusement, on ne retrouve pas la séquence Ala - Ser – Ser – (Asp/Asn) – Gln – Glu – Phe dans la séquence de NARQ. Quand on soumet cette dernière séquence aux banques de données, les serveurs sont incapables d'identifier une protéine qui contiendrait ce motif. Ce motif semble donc être inconnu.

#### I.3. Conclusions

Nous nous sommes intéressés aux effets quantitatifs et qualitatifs sur les protéines tissulaires et les protéines nucléaires d'un passage d'un milieu ammonium à un milieu nitrate de cellules en culture de chicorée. L'analyse des protéines tissulaires, ne permet pas de mettre en évidence de protéines spécifiques de l'une ou l'autre condition. Sur les gels bi-dimensionnels on peut cependant remarquer des différences d'accumulation de certaines protéines selon que les cellules ont été cultivées en présence de nitrate ou 10 20 30 40 50 60 MIVKRPVSAS LARAFFY**IVL L**SILSTGIAL LTLASSLRDA EAINIAGSLR MQSYRLGYDL

(I/L)V(I/L) (I/L) 70 80 90 100 110 120 QSGSPQLNAH RQLFQQALHS PVLTNLNVWY VPEAVKTRYA HLNANWLEMN NRLSKGDLPW

130 140 150 160 170 180 YQANINNYVN QIDLFVLALQ HYAERKMLLV VAISLAGGIG IFTLVFFTLR RIRHQVVAPL

#### D(E/Q)AN

#### (Q/E)(I/L)D

190 200 210 220 230 240 NQLVTASQRI EHGQFDSPPL DTNLPNELGL LAKTFNQMSS ELHKLYRSLE ASVEEKTRDL

250 260 270 280 290 300 HEAKRRLEVL YQCSQALNTS **QID**VHCFRHI LQIVRDNEAA EYL**ELNV**GEN WRISEGQPNP

#### (Q/E) (I/L)D (D/E)N(I/L)VP

310 320 330 340 350 360 ELPMQILPVT MQETVYGELH WQNSHVSSSE PLLNSVSSML GRGLYFNQAQ KHFQQLLLME

370 380 390 400 410 420 ERATIARELH DSLAQVLSYL RIQLTLLKRS IPEDNATAQS IMADFSQ**ALN DA**YRQLRELL

#### A(N/D)DA

430 440 450 460 470 480 TTFRLTLQQA DLPSALREML DTLQNQTSAK LTLDCRLPTL ALDAQMQVHL LQIIREAVLN

#### A(N/D)DA

490 500 510 520 530 540 AMKHANA**SEI AV**SCVTAPDG NHTVYIRDNG IGIGEPKEPE GHYGLNIMRE RAERLGGTLT

#### SE(I/L)V(D/N)

550 560 566 FSQPSGGGTL VSISFRSAEG EESQLM

*Figure 65:* Alignement de la séquence en acides aminés de NARQ d'Escherichia coli avec certains motifs séquencés à partir de la protéine 2. Les acides aminés parfaitement conservés sont en rouge et ceux qui différent sont en vert.

*NB* : le code des acides aminés est disponible en Annexe 1.

d'ammonium. Afin de cibler des facteurs de transcription éventuels, nous avons abordé l'isolement des protéines nucléaires. Nous avons remarqué des différences beaucoup plus marquées qu'avec les protéines tissulaires. Il existe des protéines spécifiques de chaque condition, ainsi que des différences dans l'accumulation de certaines protéines en fonction de la source azotée. Nous avons prélevé 5 de ces protéines afin d'en réaliser une caractérisation par spectrométrie de masse. Il en résulte des homologies avec les protéines isolées chez Arabidopsis thaliana mais dont le rôle est inconnu pour les protéines 3 et 5. La protéine 4 présente des homologie de spectre avec une protéine impliquée dans l'utilisation de l'azote chez certaines bactéries. Les protéines 1 et 2, spécifiques de la nutrition en ammonium et en nitrate respectivement, ont été séquencées. Les séquences obtenues à partir de la protéine 1 sont insuffisantes pour nous donner une idée de son rôle. En effet, nous ne disposons que de 3 motifs de 2 ou 3 acides aminés, ce qui est trop peu pour rechercher des homologies avec des protéines connues. La protéine 2, spécifique de la condition nitrate, présente de nombreuses homologies avec la protéine NARQ d'Escherichia coli. NARQ joue un rôle dans la réponse au nitrate chez cette bactérie. Elle semblerait activer les gènes NARL et NARP en réponse à la présence de nitrate.

Cependant, un motif séquencé de la protéine 2 n'est pas retrouvé dans la protéine NARQ. Ce motif, Ala - Ser – Ser – (Asp/Asn) – Gln – Glu – Phe, n'est d'ailleurs retrouvé dans aucune protéine connue des banques de données, et ceci quel que soit le règne étudié.

Dans notre recherche de facteurs de transcription, nous avons étudié l'effet du passage d'un milieu ammonium à un milieu nitrate sur l'accumulation de certaines protéines. Nous avons donc basé cette étude sur le fait que les facteurs de transcription puissent être codés par des gènes dont l'expression varie en fonction de la source azotée. Cependant, nous sommes actuellement dans l'impossibilité de dire si cette hypothèse est valable ou non. En effet, on peut imaginer que les facteurs de transcription soient des protéines produites de façon constitutive dans la cellule et que leur action soit basée sur un changement de conformation allostérique. On peut supposer que le nitrate, directement ou indirectement, puisse créer une transition allostérique du facteur de transcription et ainsi entraîner une modification de la conformation au niveau du site de liaison à l'ADN. Cette modification allostérique entraînant une affinité plus ou moins forte pour une séquence cible du promoteur du gène *nia*, qui activerait ou réprimerait l'expression du gène de la NR.





*Figure 66:* Isolement des fragments du promoteur du gène de la nitrate réductase de chicorée pour les expériences de retard sur gel par digestion avec l'enzyme de restriction HinfI.



Figure 67: Représentation schématique des fragments du promoteur du gène nia isolés pour les expériences de retard sur gel. Les séquences régulatrices site putatif d'initiation de la transcription et boîte TATA sont représentées des rectangles gris.

# II. Etude du promoteur de la nitrate réductase de la chicorée par des expériences de retard sur gel

Les expériences de retard sur gel ont été entreprises dans le but de déterminer les régions du promoteur *nia* de la chicorée impliquées dans le processus de réponse au stimulus nitrate par des liaisons avec des protéines nucléaires, facteurs de transcription putatifs. Par de telles expériences de retard sur gel, il est en effet possible de déterminer les régions de l'ADN sur lesquelles les facteurs de transcription viennent activer ou réprimer la transcription du gène. Cependant, ces expériences ne donnent que des indications sur le nombre de protéines qui se lient à l'ADN. Il n'est en effet pas possible de donner une idée des masses moléculaires des protéines se liant à l'ADN.

# II.1. Isolement des fragments de promoteur et extraction des protéines nucléaires

Le promoteur *nia* cloné a été digéré par *Hin*d III et *Bam*H I de façon à isoler un fragment de 907 pb correspondant à la presque totalité du promoteur. Puis, avec une digestion par *Hin*f I de ce fragment de 907 pb, nous obtenons 5 fragments représentant la quasi-totalité du promoteur à notre disposition. Ces 5 fragments ont ensuite été purifiés de façon à s'assurer qu'il n'y ait pas contamination par des fragments d'autres tailles (figure 66 et 67). Ces 5 fragments ont des tailles de 89, 145, 168, 225 et 274 pb. Les expériences de retard sur gel seront entreprises avec ces fragments.

La culture cellulaire de chicorée a été placée dans des conditions d'induction et de répression de l'activité nitrate réductase. Comme décrit dans le chapitre précédent, après trois jours de culture sur milieu ammonium, l'ANR est à son plus faible niveau. Une extraction de protéines nucléaires a alors été effectuée. Afin d'extraire des protéines nucléaires en condition d'induction de l'ANR, nous avons prélevé les cellules préalablement cultivées pendant trois jours en milieu ammonium puis 90 minutes en milieu nitrate.

Les expériences de retard sur gel seront toujours effectuées avec des protéines nucléaires ayant été extraites dans ces deux conditions.

#### II.2 Retards sur gel

Les retards sur gel sont utilisés pour mettre en évidence l'attachement de protéines sur un fragment d'ADN. Les conditions dans lesquelles ces retards sur gel sont réalisés correspondent à des conditions *in vitro*. Il se peut donc qu'elles ne reflètent pas exactement les conditions *in vivo*. Ces retards sur gels fournissent donc une première indication quant au nombre de protéines qui pourraient s'attacher sur un fragment d'ADN donné, mais des conditions de tests *in vivo* seront nécessaires pour confirmer les attachements éventuels. Ici, nous allons réaliser des expériences de retards sur gel avec différents fragments du promoteur et des protéines nucléaires isolées dans différentes conditions. Lorsqu'on utilise des extraits bruts, un acide nucléique de synthèse, le poly(dI-dC).poly(dIdC) nommé plus couramment dIdC, est ajouté au mélange réactionnel afin de prévenir ou de limiter les interactions non-spécifiques des protéines nucléaires avec la sonde.

Lorsqu'un attachement est obtenu, des essais de spécificité de cet attachement doivent être réalisés. Pour tester cette spécificité, de l'ADN hétérologue doit être utilisé en large excès. Si l'attachement n'est pas spécifique, le signal diminuera avec l'augmentation de la quantité de l'ADN hétérologue. Ensuite, toujours afin de tester cette spécificité, on doit réaliser des compétitions entre le fragment marqué et le même fragment non marqué en large excès.

Dans les expériences décrites ci-dessous, nous allons adopter un schéma qui sera appliqué pour chaque fragment testé. Sur chaque autoradiographie, un puits contiendra le fragment d'ADN testé (sonde), les dIdC mais pas d'extrait nucléaire (EN), ceci afin de localiser la sonde sur le gel. Ce puits sera annoté: sonde + dIdC – EN. Ensuite, afin de montrer l'importance des dIdC, un puits contiendra le fragment d'ADN avec les extraits nucléaires mais sans les dIdC (sonde + EN – dIdC). Enfin, les autres puits contiendront les trois éléments, à savoir le fragment d'ADN, les dIdC et les extraits nucléaires qu'ils proviennent de la condition nitrate (EN NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou de la condition ammonium (EN NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Par contre, les expériences de compétitions n'ont pas pu être réalisées au cours de cette thèse. Il seront réalisés ultérieurement.



Figure 68: Autoradiographie des retards sur gel effectués avec le fragment I (89 pb) du promoteur. 1: sonde + dIdC - EN. 2: sonde -  $dIdC + EN NO_3$ . 3: sonde +  $dIdC + NO_3$ . 4: sonde +  $dIdC + EN NH_4^+$ . 5: sonde -  $dIdC + EN NH_4^+$ .



Figure 69: Autoradiographie des retards sur gel effectués avec le fragment II du promoteur. 1 : sonde + EN - dIdC. 2 : sonde + dIdC. 3 : sonde +  $EN NO_3^{-}$  + dIdC. 4 : sonde +  $EN NH_4^{+}$  + dIdC. 5 : sonde +  $EN NH_4^{+}$  - dIdC.

Recherche de protéines impliquées dans la réponse à la source azotée

II.2.1. Fragment I (89 pb)

<sup>5'</sup> actccaaac<u>a cgt</u>cactctc tttcactaaa tatatatt aaaaaatata bZiP tgtggagatg taaatatttg tatttc<u>gatt a</u>aataaacg 3'

Les expériences de retard sur gel avec le fragment I, de 89 pb, montrent que 5 protéines nucléaires se lient à cette partie du promoteur (figure 68). Selon que les protéines soient extraites de cellules cultivées avec nitrate ou avec ammonium, ce sont toujours ces 5 mêmes protéines qui s'attachent.

Les réactions de compétitions qui seront réalisées nous indiquerons s'il existe, parmi ces protéines, des protéines qui agissent comme activateur ou comme répresseur ou alors, si ce sont des protéines qui se lient de façon non-spécifique.

#### II.2.2. Fragment II (145 pb)

<sup>5</sup> actett caettagaac ataatatate ttaaaacaee ttatttataa NIT-2 gtaat<u>gaata</u> ttgactgttt gtgtetteet egtaaagtaa atgtgttttg ASF-1 ARF-1 <u>atta</u>teetaa tatatataat aetetaatae teteaatett aataataag 3, NIT-2

Les réactions de liaison entre les protéines nucléaires extraites de cellules cultivées avec nitrate et le fragment II nous montrent que 6 protéines s'attachent (figure 69). Quand on réalise la réaction avec les protéines extraites de la condition ammonium, 2 protéines s'attachent. Il semblerait donc que quatre protéines se lient spécifiquement au fragment II quand les cellules sont cultivées en milieu nitrate.

La séquence nucléotidique du fragment II révèle l'existence supposée de 2 sites de liaison à NIT2 ainsì que deux éléments GATA. On peut donc supposer qu'il existerait dans la culture cellulaire de chicorée des éléments ressemblant à NIT2, comme il a été montré chez la tomate (Daniel-Vedèle et Caboche, 1993).



Figure 70:

Autoradiographie des retards sur gel effectués avec le fragment III (168 pb) du promoteur. 1: sonde +  $EN NO_3^-$  - dIdC. 2: sonde - EN + dIdC. 3: sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC. 4: sonde +  $EN NH_4^+$  + dIdC. 5: sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC +  $50xDC8 (102) \cdot 6$ : sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC +  $500xDC8 (102) \cdot 7$ : sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC +  $50xDC8 (258) \cdot 8$ : sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC +  $500xDC8 (258) \cdot 8$ : sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC +

Concernant les deux protéines se liant à ce fragment II, lorsque les cellules sont cultivées sur nitrate ou sur ammonium, on peut supposer qu'il puisse s'agir de protéines se liant aux séquences reconnues par les facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'auxine : ARF-1 et ASF-1.

#### II.2.3. Fragment III (168 pb)

```
<sup>5'</sup>a ctcttttt<u>aC gt</u>catcattt ctttattata aagaaatcgc aagattttat
bZiP
tactagttca tagttttctt gatggtatat atatacacac acgcatgagt
+1
gttcattaag gcaaccttgt gtctcacttt tctcggcaca gcaagcaaca
gggaagctga ccaactg 3'
```

Quand des protéines nucléaires sont extraites en conditions d'induction de la NR par le nitrate, il existe 3 protéines se liant au fragment III (figure 70). Quand on se place en conditions telles qu'on ait une ANR faible, 2 de ces 3 protéines se lient toujours au fragment III. Il semblerait donc qu'il y ait 1 protéine spécifique se liant au niveau de cette région du promoteur en condition nitrate.

Le fragment III contient en fait les boîtes régulatrices TATA et site putatif d'initiation de la transcription. On peut donc se demander si les protéines s'accrochant sur le fragment ne le font pas sur ces boîtes régulatrices. Pour tester cela, nous avons effectué des réactions de compétition entre le fragment III et des fragments du promoteur DC8 de la carotte (Goupil *et al.*, 1992). Nous avons amplifié par PCR un fragment de 102 pb contenant la boîte TATA et un fragment de 285 pb contenant la boîte TATA et le site d'initiation de la transcription de promoteur DC8. Quand on ajoute ces fragments 50 à 500 fois équimolairement au fragment III lors des réactions de liaison, on peut remarquer que les protéines se lient également pour ces fragments. Il semble donc que les protéines nucléaires s'attachant au fragment III soient des protéines impliquées dans les processus de transcription.





Figure 71: Autoradiographie des retards sur gel effectués avec le fragment IV (225 pb) du promoteur. 1: sonde + dIdC -EN. 2: sonde - dIdC + EN  $NO_3^-$ . 3: sonde + dIdC + EN  $NO_3^-$ . 4: sonde - dIdC + EN  $NH_4^+$ . 5: sonde + dIdC + EN  $NH_4^+$ .

Figure 72: Autoradiographie des retards sur gel effectués avec le fragment V (274 pb) du promoteur. 1 : sonde + dIdC - EN. 2 :sonde +  $EN NO_3^-$  - dIdC. 3 : sonde +  $EN NO_3^-$  + dIdC. 4 : sonde +  $EN NH_4^+$  dIdC. 5 : sonde +  $EN NH_4^+$  + dIdC.

*II.2.4. Fragment IV (225 pb)* 

5'	a gtcttttta	tca <u>gata</u> taa	a tctaataat	c cttatgtat	t taggagacaa
		NIT-2			
	aatttattta	gcagaaagtt	gagatgtaat	ctaatacgat	ccaacatatg
	tggcctcgtc	aatctttggc	ccccaaattt	tgtttttatt	ttttttctct
	tttgtgttca	agtggatgca	tccccaatgc	ttgctgtggc	tcgctcattt
	acctcctttt	tctcccaaga	gctgctttag	31	

Les réactions de liaison entre les protéines nucléaires des deux conditions, nitrate et ammonium, montrent la liaison de 2 protéines sur le fragment IV du promoteur (figure 71). Il semblerait donc qu'il n'existe pas de protéine spécifique d'une condition ou de l'autre se liant sur ce fragment du promoteur. Les réactions de liaison ADN-protéines réalisées sont réalisés en conditions *in vitro*. L'existence de motifs NIT-2 et GATA sur ce fragment ne signifie pas que des facteurs de transcription reconnaissant ces motifs se lieront avec eux du fait (i) des conditions *in vitro* et (ii) du fait que ces motifs sont des sites de liaisons putatifs.

**II.2.5.** Fragment V (274 pb)

<sup>5</sup> 'catcgtggtt	aaagaagaat	tttttccctt	tttttctaac	tctgattggg
tgaaagtttg	taaacaatgg	aaaataaaca	taattcagga	a <u>gatta</u> aatt
taaaaacatg	acttttttaa	tgtcaatgaa	ac	
AS	F-1			
	gtatttt	tgcattaaat	aaaaatgaaa	cgactacata
			ASF-	-1
tagttgaacc	attaaaattg	ttatatatta	agttcattaa	gtgagagaaa
aaaaacaaa	aaacagcacc	ttag 3'		

Le fragment V lie 2 protéines qu'elles proviennent de la condition nitrate ou de la condition ammonium (figure 72). On pourrait supposer qu'il puisse s'agir ici, comme dans le cas du fragment II, de protéines se liant sur les AuxRE ASF-1, puisque le milieu de culture cellulaire contient beaucoup d'auxines. Par contre, on pouvait s'attendre à trouver au moins une protéine spécifique au nitrate se liant dans cette zone du promoteur puisque
celle-ci contient la séquence commune à tous les promoteurs de gènes *nia* et *nii* définie par Hwang *et al.* (1997).

## II.3. Conclusions

Le but des expériences de retard sur gel est de mettre en évidence les complexes ADN-protéines. Nous avons digéré le fragment cloné du promoteur nia par Hinf I pour obtenir 5 fragments qui ont été testés dans le but de mettre en évidence des régions impliquées dans la réponse au nitrate. Dans le premier chapitre de résultats, « clonage et caractérisation du promoteur du gène de la NR », nous avions remarqué l'existence de trois motifs TATC cibles du facteur de transcription NIT-2, ainsi qu'une séquence ACTCA noyau d'un motif commun aux promoteurs de gènes de NR et NiR (Hwang et al., 1997). Avec les expériences de retard sur gel décrites ici, ont peut remarquer que, dans nos conditions, il ne semble pas avoir de liaison de protéine spécifique de la condition nitrate sur les fragments I, IV et V. En effet, sur le fragment I, qui porte une séquence GATA et un noyau pour un facteur bZIP (ACGT), 5 protéines s'attachent quelle que soit la condition de culture. Pour le fragment IV, contenant un site NIT2 et un site GATA, nous observons l'attachement de deux protéines en condition nitrate comme en condition ammonium. Pour le fragment V, nous obtenons également 2 protéines indépendamment de la nature de la source azotée. Ce fragment contient pourtant la séquence décrite par Hwang et al. (1997) comme étant commune aux promoteurs de gènes nia et nii de végétaux supérieurs. On aurait pu s'attendre à trouver un attachement spécifique sur cette séquence en condition nitrate. Le fragment III, contenant les éléments régulateurs TATA et site d'initiation de la transcription putatif, semble s'attacher avec une protéine spécifique de la condition nitrate. Cependant, il semble que les trois protéines s'attachant sur cette partie du promoteur en condition nitrate soient spécifiques des éléments régulateurs TATA et site putatif d'initiation de la transcription. Enfin, le fragment II du promoteur, compris entre les nucléotides -391 et -536 par rapport à l'initiation supposée de la transcription, semblerait impliqué dans la réponse au nitrate. En effet, deux protéines nucléaires se lient préférentiellement sur cette région en condition nitrate par rapport à la condition ammonium. La séquence nucléotidique de ce fragment montre l'existence de deux sites GATA et deux sites NIT2.

Les expériences qui seront entreprises seront de réaliser des tests de compétition afin de confirmer l'attachement spécifique des différentes protéines sur le promoteur *nia* cloné.

## Conclusions

## Perspectives

Conclusions & Perspectives

Les études menées au laboratoire avant le début de ce travail de thèse étaient basées sur l'étude de la régulation de la nitrate réductase.

Afin d'entreprendre les études de la régulation du gène de la nitrate réductase chez la chicorée au niveau moléculaire, le clonage du promoteur du gène *nia* était nécessaire.

Dans un premier temps nous avons entrepris l'isolement du promoteur par criblage d'une banque d'ADN génomique. Les clones obtenus se sont révélés chimériques et ne contenaient pas la région 5' recherchée. Nous avons abandonné cette technique pour entreprendre celle de la PCR-Inverse. La technique de PCR-I permet de rechercher une région d'ADN inconnue adjacente à une région connue. Par digestion de l'ADN génomique par BamH I, nous avons mis en évidence une région d'environ 1700 pb intéressante pour l'amplification du promoteur du gène nia. Après amplification par PCR-I, un fragment de 1700 pb environ a été cloné. Deux clones ont été obtenus. Les deux extrémités de ces clones ont été séquencées, les séquences obtenues se sont avérées identiques entre elles et très homologues (à plus de 99%) à la séquence connue du gène nia. Nous avons donc séquencé la région contenue entre ces deux extrémités. La séquence obtenue contient 932 pb. Par alignement avec des promoteurs de gènes codant pour la NR chez d'autres végétaux supérieurs nous avons mis en évidence que les régions conservées étaient composées des régions régulatrices TATA et d'un site putatif d'initiation de la transcription. Par analyse informatique de la séquence promotrice, nous avons identifié des séquences présentant des homologies avec des sites reconnus par divers facteurs de transcription, tels NIT2, ARF-1, ASF-1 ou encore des régions GATA.

Afin de tester la fonctionnalité du promoteur *nia* cloné, une construction p*nia:Uid*A a été réalisée et introduite, via *Agrobacterium tumefaciens*, dans des chicorées. La technique de transformation de la chicorée a été mise au point au laboratoire par M. Abid (Abid *et al.*, 1995). Les cotylédons étiolés étant les explants les plus efficaces pour la transformation, nous avons effectué leur transformation avec la construction p*nia:Uid*A. Nous avons obtenu 17 transformants après régénération de bourgeons. Sur ces 17 plantes, 11 contiennent à la fois les gènes *NptII* et *UidA*. De ces 11 plantes potentiellement

transformées, nous avons obtenu des graines de 6 plantes. Nous n'avons obtenu que peu de graines de chicorée transformée. La chicorée étant une plante préférentiellement allogame (le taux peut varier de 60 à 95%), on obtient généralement peu de graines. Les graines ont germé sur un milieu ammonium ou sur un milieu nitrate. Les descendants de ces transformants primaires ont une activité NR 3 fois supérieure après germination sur milieu nitrate que sur milieu ammonium. L'activité ß-glucuronidase de cette descendance a également été mesurée. Une seule plante présente une activité GUS significative. Cette plante, n°8, présente une activité GUS nettement supérieure sur milieu nitrate que sur milieu ammonium (80 fois plus dans les cotylédons et 101 fois plus dans les racines). L'activité GUS dans les plantes transformées 35S: *Uid*A est égale sur milieu nitrate à celle sur milieu ammonium. La plante n°8 présente donc une activité plus importante du promoteur NR cloné de chicorée dans le milieu nitrate. De plus, l'activité GUS mesurée dans les racines de la plante n°8 est 3 fois supérieure à celle mesurée dans les cotylédons sur le milieu nitrate. De tous ces résultats, on peut conclure que le promoteur nia cloné est fonctionnel. Nous retrouvons le schéma classique de régulation de l'expression de la NR chez la jeune plantule de chicorée (Dorchies et Rambour, 1985). Nous avons remarqué que l'activité  $\beta$ -glucuronidase était environ 90 fois plus élevée en milieu nitrate qu'en milieu ammonium, alors que la différence d'activité NR entre les deux conditions n'est que de 3 fois. Ceci pourrait être due à une différence de stabilité des enzymes  $\beta$ -glucuronidase et NR. En effet, la NR pourrait avoir une demi-vie plus courte lorsqu'elle fonctionne en présence de son substrat (condition nitrate) comparée à la demi-vie en absence de substrat (condition ammonium). La demi-vie de la  $\beta$ -glucuronidase ne devrait pas varier en fonction de la source d'azote. Il est envisagé de poursuivre les études sur les plantes transformées par des expériences de Northern blot afin de confirmer si l'augmentation d'activité GUS correspond à une augmentation du nombre de transcrits UidA. Nous n'avons pas réalisé ces expériences à cause du faible nombre de graines obtenues. Nous avons privilégié l'obtention de générations suivantes afin de produire des graines plutôt que de risquer de perdre cette plante.

Il serait intéressant de poursuivre la localisation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase par des coupes dans des racines entières. Les essais préliminaires que nous avons réalisés confirment les expériences d'hybridation *in situ* sur organe entier réalisées au laboratoire (Palms *et al.*, 1996). En effet, l'expression de la  $\beta$ -glucuronidase est principalement localisée dans les apex latéraux de racines ainsi que dans l'apex racinaire.

Afin de confirmer la fonctionnalité du promoteur *nia* cloné, montrée par la plante n°8, nous avons entrepris la transformation d'une suspension cellulaire de chicorée par des agrobactéries contenant la construction p*nia*:*Uid*A.

Chez la chicorée, l'induction de la NR par son substrat, le nitrate, avait été montré au laboratoire par B. Palms (1995) dans des jeunes plantules. Cette induction de l'ANR n'est observable que dans les racines, mais jamais dans les feuilles. Dans les cellules en culture de chicorée, nous n'avions pas de renseignements quant à la régulation de l'expression de la NR par le nitrate. Durant notre travail, nous avons montré que les cultures cellulaires de racines de chicorée montrent une baisse de l'ANR et de l'accumulation de transcrits NR lors du passage d'un milieu nitrate à un milieu ammonium. Ces baisses sont maximales au bout de trois jours. Lorsqu'une culture cellulaire de chicorée, ayant poussé sur milieu ammonium, est transférée dans un milieu nitrate, nous observons (i) une augmentation très rapide de la quantité de nitrate endogène, (ii) une accumulation de transcrits NR très rapide également (90 minutes), (iii) une accumulation de protéine NR, (iv) une augmentation de l'ANR *in vitro*. Dans les cellules en culture de chicorée, nous observons donc un schéma classique de régulation de la NR par son substrat.

La culture cellulaire étant régulée par le nitrate, nous avons pu commencer l'étude de sa transformation par les agrobactéries contenant p*nia:UidA*.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique rapide de détection et d'estimation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase d'une culture cellulaire en microplaques. Pour cela, nous avons utilisé une suspension cellulaire d'Arabidopsis thaliana transformée par une construction p35S:UdiA. Nous montrons que la mesure de fluorescence est une bonne estimation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase et qu'il est possible, par un test statistique, de définir comme transformée, à 1% d'erreur près, une population de cellules incubée en présence d'agrobactéries par rapport à une population de cellules témoin. Nous utilisons le terme de cellules transformée arbitrairement. En effet, nous ne vérifions pas si le transgène est intégré dans le génome, mais uniquement si il y a expression du transgène. Nous utilisons donc ce terme par commodité pour transformation transitoire. Après co-culture des cellules de chicorée avec des agrobactéries contenant la construction pnia: UidA, nous montrons que la culture cellulaire contient environ 80% de cellules transformées. Cette culture de cellules transformées est ensuite placée en condition nitrate ou ammonium. Nous montrons ainsi que 11% des puits en condition nitrate sont significativement supérieurs aux puits en condition ammonium. Cependant, ceci n'est que le résultat d'une première expérience. Il nous faudra répéter ces expériences afin de confirmer un schéma de

108

régulation en fonction de la source azotée de l'activité  $\beta$ -glucuronidase dans les cellules transformées.

La poursuite du travail prévoit de réaliser des expériences de délétions du promoteur *nia* cloné. Après introduction de ces fragments de promoteur contrôlant un gène rapporteur *UidA*, il pourrait être possible de mettre en évidence des régions du promoteur NR impliquées dans la réponse au nitrate.

Afin de rechercher des protéines interagissant avec le promoteur nia, donc des facteurs de transcription potentiels impliqués dans la régulation de l'expression de la NR par la source azotée, nous avons réalisé des expériences de retard sur gel. Nous avons pu montrer que certaines protéines nucléaires se lient au promoteur en condition nitrate et ammonium. Ainsi on a pu mettre en évidence 4 protéines spécifiques de la condition nitrate s'attachant sur le fragment II (145 pb) du promoteur NR cloné. Afin de confirmer ces expériences de retard sur gel, il serait intéressant de réaliser des réactions de compétition. Les réactions de compétitions consistent à chasser l'ADN marqué avec de l'ADN non homologue froid afin de tester la spécificité de l'attachement des protéines pour le fragment d'ADN marqué. Si l'attachement avec le fragment marqué diminue, on peut supposer que la liaison n'était pas spécifique. Dans le cas où l'attachement semble spécifique à un fragment, il faudra réaliser des compétitions en chassant le fragment marqué avec le même fragment mais froid. Dans ce cas, si l'attachement avec le fragment marqué diminue, on peut dire que cet attachement est spécifique du fragment. De plus, il serait intéressant d'effectuer des expériences de chromatographie d'affinité en se servant des séquences nuléotidiques interagissant avec les protéines nucléaires.

La chromatographie d'affinité (figure 73) permet de purifier des protéines se liant spécifiquement à certaines séquences d'ADN. Un oligonucléotide portant certaines séquences du promoteur pourrait être ligaturé en longues séquences répétées qui seraient ensuite couplées chimiquement à une résine. Les fractions protéiques éluées à concentrations salines élevées seraient récupérées et une caractérisation de ces protéines serait alors entreprise. Le séquençage de ces protéines entrepris, l'isolement des ADNc codant pour ces protéines serait alors réalisé à partir d'oligonucléotides dégénérés.

Des protéines nucléaires ont été extraites dans des conditions d'induction et de répression de l'ANR afin de réaliser des expériences de retard sur gel. Il est envisagé de réaliser des expériences de « South-Western » afin d'essayer de caractériser ces protéines.

Pour cela, on réaliserait une migration des extraits de protéines nucléaires en gel de polyacrylamide, puis le transfert des protéines sur membrane serait effectué comme lors de la réalisation d'un « Western Blot ». La membrane serait incubée avec les sondes nucléiques à étudier, marquées au P<sup>32</sup> comme pour les expériences de retard sur gel. On aurait alors une idée de la taille des protéines sur lesquelles les sondes se sont hybridées. Il serait alors possible de relier ces résultats avec ceux entrepris pour l'isolement des facteurs de transcription par chromatographie d'affinité.



Figure 73: Principe de la chromatographie d'affinité (d'après «ADN Recombinant», DeBoeck Université). Cette technique permet d'isoler les protéines qui se lient spécifiquement à certaines séquences nucléotidiques.

Afin de caractériser des protéines, facteurs de transcription potentiels, dont l'expression est différentielle en fonction de la source azotée, nous avons entrepris des expériences de migrations en 2D de protéines en gels de polyacrylamide. Cependant, avant d'entreprendre ces expériences, nous devons formuler le postulat que les facteurs de transcription recherchés soient également accumulés de façon différentielle en fonction de la source d'azote. Nous ne savons pas actuellement si ce postulat est valable ou non. En effet, on peut également imaginer que le nitrate agisse, directement ou indirectement, en créant une transition allostérique du facteur de transcription et ainsi entraîner une modification du site de liaison à l'ADN. Cette modification allostérique pourrait alors entraîner une baisse ou une hausse de l'affinité du facteur de transcription pour la séquence cible du promoteur. Si un tel mécanisme était mis en œuvre, le facteur de transcription pourrait alors être exprimé de façon constitutive.

Lors de l'induction de l'ANR par le nitrate dans les cultures cellulaires, nous avons montré qu'il existe des différences quant aux protéines nucléaires présentes. De plus, il existe deux protéines spécifiques à chacune des conditions. 5 protéines nucléaires furent ainsi prélevées à partir des gels bidimensionnels, 3 dont l'accumulation est plus élevée dans la condition nitrate ainsi que les 2 protéines retrouvées dans l'une ou l'autre des conditions. Ces 5 protéines ont subi une digestion trypsique afin de réaliser un spectre MALDI-TOF par un spectromètre de masse. On obtient ainsi la masse des peptides qui constituent ces protéines. Il est cependant assez difficile d'obtenir des informations concernant les familles auxquelles ces protéines peuvent appartenir du fait du peu de renseignements à notre disposition dans le règne végétal. Deux protéines, celles spécifiques de chaque condition, ont été soumises à un micro-séquençage par nano-spray. On a ainsi pu obtenir des fragments de séquences d'acides aminés qui ont été soumises à des banques de données afin de tenter de les identifier. Il existe des homologies entre la protéine 2 et la protéine NARQ d'Escherichia coli. Cette protéine est impliquée dans la transduction du signal nitrate, elle active les protéine NARL et NARP par phosphorylation. Cependant, une séquence d'acides aminés obtenue de la protéine 2 n'est pas retrouvée dans cette protéine NARQ. Ce motif (Ala-Ser-Ser-(Asn/Asp)-Gln-Glu-Phe) n'est retrouvé dans aucune des protéines connues des banques de données.

La suite de ce travail sera donc de synthétiser des oligonucléotides dégénérés, situés dans les régions homologues, afin d'amplifier, dans une population d'ADNc, les séquences codant pour les protéines isolées. Les ADNc seront obtenus à partir d'ARNm de cellules de chicorée ayant poussé dans un milieu ammonium pendant 3 jours et repiquées ou non dans un milieu nitrate. On espère ainsi isoler des gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de la NR par la source d'azote.

On peut également entreprendre des expériences d'AFLP-ADNc, technique au point au laboratoire. Cette technique permet de mettre en évidence des gènes exprimés de façon différentielle entre deux conditions. Elle pourrait donc nous apporter de nombreux renseignements quant aux gènes mis en œuvre dans la réponse au nitrate, mais aussi sur les gènes répondant au nitrate.

La technique d'AFLP-ADNc dans le but d'isoler les gènes codant pour les facteurs de transcription implique que ces gènes soient exprimés de façon différentielle en fonction de la source d'azote. Nous rejoignons en ce sens le postulat que nous avions proposé lors de l'isolement de protéines par les gels 2D.

## Références Bibliographiques

bel S., Oeller P.W. et Theologis A. (1994) Early auxin-induced genes encode shortlived nuclear protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:326-330.

Abel S. et Theologis A. (1995) A polymorphic bipartite motif signals nuclear targeting of early auxin-inducible proteins related to PS-IAA4 from pea (*Pisum sativum*). *Plant J.* 8(1):87-96.

Abid M., Palms B., Derycke R., Tissier J.P. et Rambour S. (1995) Transformation of chicory and expression of the bacterial *uid*A and *npt*II genes in the transgenic regenerants. *J. Ex. Bot.* 46(284):337-346.

Aryan A.P. et Wallace W. (1985) Reversible inactivation of wheat leaf nitrate reductase by NADH, involving superoxide ions generated by the oxidation of thiols and FAD. *Biochim. Biophy. Acta.* 827 (3):215-220.

Avila J., Nieto C., Cañas L. Benito M.J. et Paz-Ares J. (1993) Petunia hybrida genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal myb proto-oncogenes. *Plant J.* 3:553-562.

achmann M., Huber J. L., Gurdeep S. A., Wu K., Ferl R. J. et Huber S. C. (1996) 14-3-3 Broteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Letters*. 398:26-30.

Baijal M. et Sane P.V. (1988) Arginine residue(s) at the active site(s) of the nitrate reductase complex from *Amaranthus*. *Phytochem*. 27:1969-1972.

Banowetz G.M. (1992) The effects of endogenous cytokinin content on benzyladenineenhanced nitrate reductase induction. *Physiol. Plant.* 86:341-348.

Birnboim H. et Doly J. (1979) A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7:1513-1523.

Bloom A.J., Caldwell R.M., Finazzo J., Warner R.L. et Weissabrt J. (1989) Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. *Plant Physiol*. 91:898-901.

Bouazza A.(1993) Etude des activités péroxidasiques et auxine-oxydasique au cours de la morphogenèse de tissus de racines de *Cichorium intybus* L. cultivés *in vitro*. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the prinicpe of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brown T.A. (1991) Molecular Biology Labfax, Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Buchanan B.B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:341-374.

Bueno M.S., Alonso A. et Villalobos N. (1994) Nitrate reduction in cotyledons of *Cicer* arietinum L.: regulatory role of cytokinins. *Plant Sci.* 95(2):117-124.

Bungard R.A., Wingler A., Morton J.D., Andrews M., Press M.C. et Scholes J.D. (1999) Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in *Clematis vitalba*. *Plant Cell. Environ*. 22(7):859-866.

Burger G., Strauss J., Scazzochio C. et Lang B.F. (1991a) Nir A, the pathway specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.* 11:5746-5755.

Burger G., Tiburn J. et Scazzochio C. (1991b) Molecular cloning and functional characterization of pathway specific regulatory gene nirA, wich controls nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans. Mol. Cell. Biol.* 11:795-802.

aboche M. et Rouzé P. (1990) Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* 6(6):187-192.

Callaci J.J. et Smarrelli J.Jr. (1991) Regulation of the inducible nitrate reductase isoform from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1088(1):127-30.

Calza R., Hunter E., Vincentz M., Rouzé P., Galangau F., Vaucheret H., Cherel I., Meyer C., Kronenberger J. et Caboche M. (1987) Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductase from higher plants. *Mol. Gen. Genet.* 209:552-562.

Campbell W.H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 50:277-303.

Campbell W. et Smarelli J. (1978) Purification and kinetics of higher plant NADH:nitrate reductase. *Plant Physiol.* 61:611-616.

Carabelli M., Sessa G., Baima S., Morelli G. et Ruberti I. (1993) The Arabidopsis Athb-2 and -4 genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J.* 4 (3):469-479.

Cataldo D.A., Haroom M., Schrader L.E. et Youngs V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitratation of salicylic acid. *Communication in Soil Sc. and Plant Analysis*. 6:71-80.

Cheng C.L., Dewdney L., Kleinhofs A. et Goodman H.M. (1986) Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 83:6825-6828.

Cheng C.L., Acedo G., Cristinsin M. et Conkling M.A. (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*. 89:1861-1864.

Chérel I., Gonneau M., Meyer F., Pelsy F. et Caboche M. (1990) Biochemical and immunological characterization of nitrate reductase deficient *nia* mutant of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant. Physiol.* 92:659-665.

Choi H.K., Kleinhofs A. et An G. (1989) Nucleotide sequence of rice nitrate reductase genes. *Plant Mol. Biol.* 13:731-733.

Chraibi A. (1988) Régulation de l'activité nitrate réductase dans des suspensions cellulaires de Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* var Witloof). Thèse de Doctorat Univerité des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.

Churchill M.E.A. et Travers A.A. (1991) Protein motifs that recognize structural features of DNA. *Trends Biochem. Sci.* 16:92-97.

CTIFL. (1995) Leteinturier J., Cochet J.P., Marle M. et Benigni M., Eds. L'endive, guide pratique Paris: Les editions du Ctifl.

Collins F.S. et Weissman S.M. (1984) Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe : a circularisation method. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*. 81:6812-6816.

Cone K.C., Cocciolone S.M., Burr F.A. et Burr B. (1993) Maize anthocyanin regulatory gene pl is a duplicate of c1 that functions in the plant. *Plant Cell*. 5:1795-1805.

Consonni G., Geuna F., Gavazzi G. et Tonelli C. (1993) Molecular homology among members of the R gene family in maize. *Plant J.* 3:335-346.

Cooper H.D., Clarkson D.T., Johnson M.G., Whiteway J.N. et Loughman B.C. (1986) Cycling amino-nitrogen between shoots in wheat seedlings. In *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*. Lambers H., Neeteson J.J. et Stule I. Eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, Pays-Bas, pp 97-100.

Cove D.J. (1979) Genetic studies of nitrate assimilation in Aspergillus nidulans. Biol. Rev. 54:291-327.

Crawford N.M., Campbell W.H. et Davis R. (1986) Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. 83:8073-8076.

Crawford N.M., Smith M., Bellissimo D. et Davis R. (1988) Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a mettaloflavoprotein with three functionnal domains. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 85:5006-5010.

Crawford N.M. et Arst H.N.Jr. (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* 27:115-146.

aniel-Vedèle F., Dorbe M.F., Caboche M. et Rouzé P. (1989) Cloning and analysis of the tomato nitrate reductase-encoding gene: protein domain structure and amino acid homologies in higher plants. *Gene*. 85:371-380.

Daniel-Vedèle F. et Caboche M. (1993) A tobacco cDNA encoding a GATA-1 zinc finger protein homologous to regulators of nitrogen metabolism in fungi. *Mol. Gen. Genet.* 240:365-373.

Daniel-Vedèle F. et Caboche M. (1996) Molecular analysis of nitrate assimilation in higher plants. *C.R. Acad. Sci. Paris. Life Sci.* 319:961-968.

Daniel-Vedèle F., Filleur S. et Caboche M. (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr. Opinion. Plant. Biol.* 1:235-239.

Dehesh K., Bruce W.B. et Quail P.H. (1990) A trans-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter. *Science* 250(4986):1397-9.

Dehesh K., Smith L.G., Tepperman J.M. et Quail P.H. (1992) GT-2: a transcription factor with twin autonomous DNA-binding domains of closely related but different target sequence specificity. *EMBO J.* 11(11):4131-44.

Dehesh K., Smith L.G., Tepperman J.M. et Quail P.H. (1995) Twin autonomous bipartite nuclear localization signals direct nuclear import of GT-2. *Plant J.* 8(1):25-36.

de la Torre A., Delgado B. et Lara C. (1991) Nitrate-dependent O<sub>2</sub> evolution in intact leaves. *Plant Physiol.* 96:898-901.

Dellaporta S.L., Wood J. et Hicks J.B. (1983) A plant DNA minipreparation : version II. *Plant Mol. Biol.* 1:19-21.

Deng M.D., Moureaux T. et Caboche M. (1989) Tungstate, a molybdate analog inactive nitrate reductase, deregulates the expression of nitrate reductase structural gene. *Plant. Physiol.* 91:304-309.

Deng M.D., Moureaux T., Chérel I., Boutin J.P. et Caboche M. (1991) Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol. Biochem.* 29:239-247.

Desprès C., Subramanaim R., Matton D.P. et Brisson N. (1995) The activation of the potato PR-10a gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell.* 7:589-598.

de Vetten N.C. et Ferl R.J. (1994) Transcriptional regulation of environmentally inducible genes in plants by an evolutionary conserved family of G-box binding factors. *Int J Biochem.* 26(9):1055-68.

Dijkshoorn W. (1962) Metabolic regulation of the alkaline effect of nitrate utilization of plants. *Nature*. 194:165-167.

Dolan J.W. et Fields S. (1991) Cell-type-specific transcription in yeast. *Biochim. Biophys.* Acta. 1088(2):155-69.

Dorbe M.F., Caboche M. et Daniel-Vedèle F. (1992) The tomato *nia* gene complements a *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutant and is properly regulated. *Plant Mol. Biol.* 18:363-375.

Dorbe M.F., Truong H.M., Crété P. et Daniel-Vedèle F. (1998) Deletion analysis of the tobacco *Nii1* promoter in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 139:71-82.

Dorchies V. et Rambour S. (1985) Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. *Physiol*. *Vég*. 23:25-35.

Douglas P., Morrice N. et MacKintosh C. (1995) Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *Fed. Europ. Biochem. Soc.* 377:113-117.

Douglas P., Moorhead G., Hong Y., Morrice N. et MacKintosh C. (1998) Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta*. 206(3):435-442.

Dubois T., Dubois J., Guedira M. et Vasseur J. (1988) Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoïdes. *C. R. Acad. Sci.* 307:669-675.

Dubois T., Guedira M., Dubois J. et Vasseur J. (1990) Direct somatic embriogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker ? *Ann. Bot.* 65:539-545.

Dugaiczyk A., Boyer H.W. et Goodman H.M. (1975) Ligation of EcoRI endonucleasegenerated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol.* 96:171-184.

Dwivedi U.N., Shiraishi N. et Campbell W.H. (1994) Identification of an essential cysteine of nitrate reductase via mutagenesis of its recombinant cytochrome b reductase domain. *J. Biol. Chem.* 269:13785-13791.

Dynan W.S. (1989) Modularity in promoters and enhancers. Cell. 58:1-4.

Ellenberger T.E., Brandl C.J., Struhl K. et Harrison S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell.* 71:1223-1237. Ellenberger T.E., Fass D., Aranud M. et Harrison S.C. (1994) Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 8:970-980.

Elmerich C. (1997) Nitrogènase: aspects biochimiques, moléculaires et génétiques. *In Assimilation de l'azote chez les plantes*. Morot-Gaudry J.F. Ed. INRA Editions. Paris. pp 163-179.

Evans T. et Felsenfeld G. (1989) The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell.* 58(5):877-85.

airall L., Schwabe J.W.R., Chapman L., Finch J.T. et Rhodes D. (1993) The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature*. 366(6454):483-7.

Fan H. et Sugiura M. (1995) A plant basal in vitro system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: supplement of green leaf component(s) drives accurate transcription of a light-responsive *rbc*S gene. *EMBO J.* 14(5):1024-31.

Faure J. D., Vincentz M., Kronenberger J. et Caboche M. (1991). Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant J.* 1:107-113.

Federova E., Greenwood J.S. et Oaks A. (1994) *In-situ* localization of nitrate reductase in maize roots. *Planta*. 194:279-286.

Fedoroff N., Schläppi M. et Raina R. (1995) Epigenetic regulation of the maize Spm transposon. *BioEssays*. 17:291-297.

Feinberg A.P. et Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Annals Biochem*. 132:6.

Feinberg A.P. et Vogelstein B. (1984) Addendum : a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Annals Biochem.* 137:266.

Feng B., Xiao X. et Marzluf G.A. (1993) Recognition of specific nucleotids bases and cooperative DNA binding by the trans-acting nitrogen regulatory protein NIT2 of *Neurospora crassa*. *Nucleic*. *Acids*. *Res.* 21:3989-3996.

Ferl R.J. (1996) 14-3-3 proteins and signal transduction. An. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 47:49-73.

Filleur S. et Daniel-Vedèle F. (1999) Characterization of a high-affinity nitrate transporter in *Arabidopsis thaliana* isolated by differential display. *Planta*. 207:461-469.

Finnie C., Borch J. et Collinge D.B. (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol. Biol.* 40(4):545-554.

Forster C., Arthur E., Crespi S., Hobbs S.L.A., Mullineaux P. et Casey R. (1994a) Isolation of a pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenase promoter by inverse polymerase chain reaction and characterization of its expression in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 26:235-248.

Forster R., Izawa T. et Chua N.H. (1994b) Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* 8:192-200.

Foyer C.H., Noctor G., Lelandais M., Lescure J.C., Valadier C., Boutin J.P. et Horton P. (1994) Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosythesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta*. 192:211-220.

Franken P., Schrell S., Peterson P.A., Saedler H. et Wienand U. (1994) Molecular analysis of protein domain function encoded by the myb-homologous maize genes C1, Zm 1 and Zm 38. *Plant J.* 6:21-30.

Friemann A., Brinkmann K. et Hachtel W. (1991) Sequence of a cDNA encoding bi-specific NADP(H) nitrate reductase from tree *Betula pendula* and the identification of conserved protein domains. *Mol. Gen. Genet.* 227:97-105.

Frohnmeyer H., Hahlbrock K. et Schäfer E. (1994) A light-responsive in vitro transcription system from evacuolated parsley protoplasts. *Plant J.* 5:437-449.

Fu Y.H. et Marzluf G.A. (1990a) Nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora* crassa encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 19:1056-1085.

Fu Y.H. et Marzluf G.A. (1990b) Site-directed mutagenesis of the "zinc finger" DNA-binding domain of the nitrogen-regulatory protein NIT2 of *Neurospora*. *Mol. Microbiol.* 4:1847-1852.

Fu Y.H. et Marzluf G.A. (1990c) nit-2, the major positive acting-nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 87:5331-5335.

Galangau F., Daniel-Vedèle F., Moureaux T., Dorbe M.F., Leydecker M.T. et Caboche M. (1988) Expression of leaf nitrate reductase gene from tomato and tobacco in relation to light dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* 88:383-388.

Gasch A., Hoffmann A., Horikoshi M., Roeder R.G. et Chua N.H. (1990) Arabidopsis thaliana contains two genes for TFIID. *Nature*. 346:390-394.

Gautheret R.J. (1953) La culture de tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson et Cie. Paris.

Gehring W.J., Affolter M. et Bürglin T. (1994a) Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63:487-526.

Gehring W.J., Qian Y.Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Scier A.F., Resendez-Perez D., Affolter M., Otting G. et Wüthrich K. (1994b) Homeodomain DNA recognition *Cell*. 78:211-223.

Gilmartin P.M., Memelink J., Hiratsuka K., Kay S.A. et Chua N.H. (1992) Characterization of a gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element. *Plant Cell.* 4:839-849.

Glaab J. et Kaiser W.M. (1993) Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots. *Planta*. 191:173-179.

Glass A.D.M. (1988) Nitrogen uptake in plant roots. Atlas Plant. Sci. 1:151-156.

Glass A.D.M., Shaff J.E. et Kochian L.V. (1992) Studies on the uptake of nitrate in barley IV. Elecrophysiology. *Plant Physiol*. 99:456-463.

Glover J.N.M. et Harrison S.C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*. 373:257-261.

Godon C., Caboche M. et Daniel-Vedèle F. (1995) Use of the biolistic process for the analysis of nitrate-inducible promoters in transient expression assays. *Plant Sci.* 111:209-218.

Goff S.A., Cone K.C. et Fromm M.E. (1991) Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev.* 5:298-309.

Gojon A., Plassard C. et Bussi C. (1994) Root/shoot distribution of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation in herbaceous and woody species. *In A Whole Plant Perspective On Carbon-Nitrogen Interactions*. Eds J. Roy et E. Garnier, SPB Ac. Publishing, Netherlands, pp 131-147.

Gordon A.J., Ryle G.J.A., Powell C.E. et Mitchell D. (1980) Export, mobilization, and respiration of assimilates in uniculum barley during light and darkness. *J. Exp. Bot.* 31:461-473.

Goupil P., Hatzopoulos P., Franz G., Hempel F.D., You R. et Sung Z.R. (1992) Transcriptionnal regulation of a seed-specific carrot gene, DC8. *Plant Mol. Biol.* 18:1049-1063.

Goupil P., Loncle D., Druart N., Belettre A. et Rambour S. (1998) Influence of ABA on nitrate reductase activity and carbohydrate metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *J. Exp. Bot.* 49(328):1855-1862.

Grasser K.D. (1995) Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *Plant J.* 7:185-192.

Gruber H., Goetnick S.D., Kirk D.L. et Schmitt R. (1992) The nitrate reductase-encoding gene of *Volvox carteri. Gene.* 120:75-83.

Guédira M., Dubois-Tylski T., Vasseur J. et Dubois J. (1989) Embryogenèse somatique directe à partir de culture d'anthères du *Cichorium* (Asteraceae). *Canad. J. Bot.* 67:970-976.

Guilfoyle T.J., Ulmasov T. et Hagen G. (1998) The ARF1 family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:619-627.

ames B.D. et Higgins (1985) S.J. Nucleic acid hybridisation, Oxford Washington DC:IRL Press, p. 245.

Hampp R., Goller M. et Ziegler H. (1982) Adenylate levels, energy change, and phosphorylation potential during dark/light and light/dark transition in chloroplasts, mitochondria, and cytosol of mesophyll protoplasts from *Avena sativa* L. *Plant Physiol*. 69:448-455.

Hanahan D. (1985) Techniques for transformation *Escherichia coli*. *In DNA cloning*. Volume 1 pp 109-135. Glover D.M. Eds. IRL Press, Oxford, Washington DC.

Harrison C.J., Bohm A.A. et Nelson H.C.M. (1994) Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science*. 263:224-227.

Hattori T., Vasil V., Rosenkrans L., Hannah L.C., McCarthy D.R. et Vasil I.K. (1992) The Viviparous-1 gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* 6:609-618.

Hayes J.J. et Tullius T.D. (1993) Nucl. Acids Mol. Biol. 7:106-119.

Hedrich R. et Schroeder J. (1989) The physiology of ion channels and electrogenic pump in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 40:539-569.

Henzel W.J., Billeci T.M., Stults J.T., Wong S.C., Grimley C. et Watanabe C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90(11):5011-5015.

Hille C.S. et Treisman R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 80:199-211.

Hiratsuka K., Wu X., Fukuzawa H. et Chua N.H. (1994) Molecular dissection of GT-1 from *Arabidopsis. Plant Cell.* 6:1805-1813.

Hoff T., Stummann M. et Henningsen K. W. (1991) Cloning and expression of a gene encoding a root specific nitrate reductase in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant.* 84:616-624.

Hoff T., Stummann M. et Henningsen K. W. (1992) Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* 84:616-624.

House C.M. et Anderson J.W. (1980) Light-dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C4-dicarboxylic acids. *Phytochem.* 19:1925-1930.

Huber S.C., Huber J.L., Campbell W.H. et Redinbaugh M.G. (1992a) Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase acitivities in spinach leaves. *Plant Physiol.* 100:706-712.

Huber J.L., Huber S.C., Campbell W.H. et Redingbaugh M.G. (1992b) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 296:58-65.

Huber S.C., Bachmann M. et Huber J.L. (1996) Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for  $Ca^{2+}$  and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci.* 1(12):432-438.

Hunter T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 80:225-236.

Huppe H.C. et Turpin D.H. (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:577-607.

Hwang C.F., Lin Y., D'Souza T. et Cheng C.L. (1997) Sequences necessary for nitratedependent transcription of *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.* 113(3):853-862.

Hyde G.E., Wilberding J.A., Meyer A.L., Campbell E.R. et Campbell W.H. (1989) Monoclonal antibody-based immunoaffinity chromatography for purifying corn and squash NADH:nitrate reductases. *Plant Mol. Biol.* 13:233-246.

Hyde G.E., Crawford N.M. et Campbell W.H. (1991) The sequence of squash NADH:nitrate reductase and its relationship of the sequences of other flavoprotein oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 266:23542-23547.

smande J. et Tourraine B. (1994) N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 105:3-7.

Izawa T., Foster R. et Chua N.H. (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. J. Mol. Biol. 230:1131-1144.

Izawa T., Foster R., Nakajima M., Shimamoto K. et Chua N.H. (1994) The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. *Plant Cell*. 6:1277-1287.

an Y.N. et Jan L.Y. (1993) HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75:827-830.

Jarai G., Truong H.N., Daniel-Vedèle F. et Marzluf G.A. (1992) NIT2, the nitrogen regulatory protein of *Nerospora crassa*, binds upstream of *nia*, the tomato nitrate reductase gene, in vitro. *Cur. Genet.* 21:37-41.

Jefferson R.A., Kavanagh G. et Bevan M.W. (1987) GUS fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.

Jensen P., Hoff T., Moller G., Stummann B. M. et Henningsen K. (1994) Identification and characterization of a nitrate reductase gene from bean (*Phaseolus vulgaris*) containing four introns. *Physiol. Plant.* 92:613-623.

Jensen P.E., Hoff T., Stummann B.M. et Henningsen K.W. (1996) Functional analysis of two bean nitrate reductase promoters in transgenic tobacco. *Physiol. Plant.* 96:351-358.

Jofuku K.D., den Boer B.G.W., van Montagu M. et Okamuro J.K. (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2.*Plant Cell* 6:1211-1225.

Joshi C.P. (1987) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl. Acids. Res.* 15:6643-6653.

aiser W.M. et Brendle-Behnisch E. (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO<sub>2</sub> availability. *Plant. Physiol.* 96 (2):363-367.

Kaiser W.M. et Spill D. (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis II. In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* 96:368-375.

Kaiser W.M., Spill D. et Brendel-Behnisch E. (1992) Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta*. 186:236-240.

Kannangara C.G. et Woolhouse H.W. (1967) The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perrila frutescens*. *New Phytol*. 66:553-561.

Katagiri F., Yamazaki K., Horikoshi M., Roeder R.G. et Chua N.H. (1990) A plant DNAbinding protein increases the number of active preinitiation complexes in a human in vitro transcription system. *Genes Dev.* 4:1899-1909. Kawahara R., Komamine A. et Fukuda H. (1995) Isolation and characterization of homeoboxcontaining genes of carrot. *Plant Mol. Biol.* 27(1):155-64.

Kerstetter R., Vollbrecht E., Lowe B., Veit B., Yamaguchi J. et Hake S. (1994) Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell*. 6(12):1877-87.

Kleinhofs A., Warner R.L., Hamat H.B., Juricek M., Huang C. et Schnorr K. (1988) Molecular genetics of barley and rice nitrate reductases. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 7:35-42.

Kleinhofs A. et Warner R.L. (1990) Advances in nitrate assimilation. In *Intermediary nitrogen assimilation*. Eds B.J. Miflin et P.J. Lea, Academic Press, San Diego. pp 89-120.

Klepper L., Flesher D. et Hageman R.H. (1971) Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.* 48:580-590.

Klepper L.A. (1979) Effects of certain herbicides and their combination on nitrate and nitrite reduction. *Plant Physiol.* 64:273-275.

Klug A. et Schwabe J.W. (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. FASEB J. 9(8):597-604.

Koes R.E., Quattrocchio F. et Mol J.N.M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants : function and evolution. *BioEssays*. 16:123-132.

Kudla B., Caddick M.X., Langdon T., Martinez-Rossi N.M., Bennett C.F., Sibley S., Davies R.W. et Arst H.N. Jr. (1990) The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.* 9(5):1355-64.

Kuhn R.M., Caspar T., Dehesh K. et Quail P.H. (1993) DNA binding factor GT-2 from *Arabidopsis. Plant Mol. Biol.* 23 (2):337-348.

Kurkdjian A. et Guern J. (1989) Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:271-303.

Kustu S., Santero E., Keener J., Poham D. et Weiss D. (1989) Expression of  $\sigma^{54}$  (ntrA)dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* 53:367-376.

am E. (1995) Domain analysis of the plant DNA-binding protein GT1a : requirement of four putative alpha-helices for DNA binding and identification of a novel oligomerization region. *Mol. Cell. Biol.* 15:1014-1020.

Lam E. et Lam K.P. (1995) Binding site requirements and differential representation of TGA factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucl. Acids. Res.* 23(18):3778-3785.

Landschulz W.H., Johnson P.F. et McKnight SL. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. 240(4860):1759-64.

Le K. et Lederer F. (1983) On the presence of a heme binding domain homologous to cytochrome b5 in *Neurospora crassa* assimilatory nitrate reductase. *EMBO J.* 2:1909-1914.

Lejay L., Quillere I., Roux Y., Tillard P., Cliquet J.B., Meyer C., MorotGaudry J.F. et Gojon A. (1997) Abolition of posttranscriptional regulation of nitrate reductase partially prevents the decrease in leaf  $NO_3^-$  reduction when photosynthesis is inhibited by  $CO_2$  deprivation, but not in darkness. *Plant Physiol.* 115(2):623-631.

Leleu O., Vuylsteker C., Têtu J.F., Degrande D., Champolivier O. et Rambour S. (2000) Effect of two contrasted N fertilizations on rapseed growth and nitrate metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* Acceptée.

Li X. Z., et Oaks A. (1993) Induction and turnover of nitrate reductase in Zea mays. Influence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Plant Physiol.* 102:1251-1257.

Li X.-Z. et Oaks A. (1995) The effect of light on the nitrate and nitrite reductases in Zea mays. Plant Sci. 109:115-118.

Lillo C. (1984) Circadian rythmicity of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61:219-223.

Lillo C. (1991) Diurnal variations of corn leaf nitrate reductase: an experimental distinction between transcriptional and post-transcriptional control. *Plant Sci.* 73:149-154.

Lillo C. (1993) Magnesium and calcium inhibition of nitrate reductase in Zea mays. Plant Physiol. 106:1145-1185.

Lillo C. (1994a) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* 90:616-620.

Lillo C. (1994b) Only the complete NADH:nitrate reductase activity is inhibited by magnesium, not the partial activities. *Plant Cell Physiol.* 35(3):515-518.

Lillo C. (1994c) Light/dark regulation of higher plant nitrate reductase related to hysteresis and calcium/magnesium inhibition. *Physiol. Plant.* 91:295-299.

Lillo C. et Ruoff P (1989) An unusually rapid light-induced nitrate reductase mRNA pulse and circadian oscillations. *Naturwissenschaften*. 76(11):526-8.

Lillo C. et Ruoff P. (1992) Hysteretic behavior of nitrate reductase. Evidence of an allosteric binding site for reduced pyridine nucleotides. *J. Biological Chem.* 267:13456-13459.

Limami A. et Laville J. (1991) Agronomie et physiologie. *In L'endive, guide pratique*. Leteinturier J., Cochet J.P., Marle M., Benigni Eds. Les éditions du CTIFL. Paris. pp 123-144.

Limami A., Roux L., Laville J. et Roux Y. (1993) Dynamics of nitrogen compounds in the chicory (*Cichorium intybus* L.) tuberised tap root during growing season and cold storage period. *J. Plant. Physiol.* 106:477-484.

Lin Y., Hwang C.-F., Brown J.B. et Cheng C.-L. (1994) 5' proximal regions of *Arabidopsis* nitrate reductase genes direct nitrate-induced transcription in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 106:477-484.

Lis J. et Wu. C (1993) Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell.* 74(1):1-4.

Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R.J. et Fu H. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*. 376:191-194.

Logan H., Basset M., Véry A.A. et Sentenac H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology. *Physiol. Plant.* 100:1-15.

Long D.M., Oaks A. et Rothstein S.J. (1992) Regulation of maize root nitrate reductase mRNA levels. *Physiol. Plant.* 85:561-566.

Lowry J.A. et Atchley W.R. (2000) Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J. Mol. Evol.* 50:103-115.

Lu J.L., Ertl J.R. et Chen C.M. (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* 98:1255-1260.

a J. (1994) The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analysis. *Genes Dev.* 8:745-756.

MacKintosh C. (1992) Regualtion of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochem. Biophys. Ac.* 1137:121-126.

Manh C.T., Boutin J.P., Provot M. et Champigny M.L. (1993) Metabolite effects for shortterm nitrogen-depedent enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activation and decrease of net sucrose synthesis in leaves. *Physiol. Plant.* 89(3):460-466.

131

Marion-Poll A., Huet J.C. et Caboche M. (1984) Regulation of nitrate reductase in protoplasts-derived cells, influence of exogenously supplied nitrate, ammonium and amino acids. *Plant Sci. Lett.* 34:61-72.

Marzluf G.A. (1993) Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:31-55.

McCarthy D.R., Hattori T., Carson C.B., Vasil V. Lazar M. (1991) The *viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell*. 66:895-905.

McClure P.R., Kochian L.V. Spanswick R.M. et Shaff J.E. (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol*. 93:281-289.

Melzer J.M., Kleinhofs A. et Warner R.L. (1989) Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* 217:341-346.

Meshi T. et Iwabuchi M. (1995) Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol*. 36(8):1405-1420.

Meshi T., Moda I., Minami M., Okanami M. et Iwabuchi M. (1998) Conserved Ser residues in the basic region of the bZIP-type transcription factor HBP-1a(17): importance in DNA binding and possible targets for phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* 36:125-136.

Mikami K., Sakamoto A. et Iwabuchi M. (1994) The HBP-1 family of wheat basic/leucine zipper proteins interacts with overlapping *cis*-acting hexamer motifs of plant histone genes. *J. Biol. Chem.* 269 (13):9974-9985.

Miyazaki, J., Juricek, M., Angelis, K., Schnorr, K. M., Kleinhofs, A. et Warner, R. L. (1991) Characterization and sequence of a novel nitrate reductase from barley. *Mol. Gen. Genet.* 228:329-334.

Mohr H., Neininger A. et Seith B. (1992) Control of nitrate reductase and nitrite reductase gene expression by light, nitrate and plastidic factor. *Bot. Acta*. 105:81-89.

Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A. et MacKintosh C. (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr. Biol.* 6(9):1104-13.

Murashige T. et Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bioasays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Murre C., Bain G., van Dijk M.A., Engel I., Furnari B.A., Massari M.E., Matthews J.R., Quong M.W., Rivera R.R. et Stuiver M.H. (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1218(2):129-35.

apier R.M. et Venis M.A. (1995) Auxin action and auxin-binding proteins. *New. Phytol.* 129:167-201.

Neininger A., Back E., Bichler J., Schneiderbauer A. et Mohr H. (1994) Deletion analysis of a nitrite-reductase promoter from spinach in transgenic tobacco. *Planta*. 194:186-192.

Niu X., Renshaw-Gegg L., Miller L. et Guiltinan M.J. (1999) Bipartite determinants of DNAbinding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol. Biol.* 41:1-13.

Nussaume L., Vincentz M., Meyer C., Boutin J.P. et Caboche M. (1995) Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. *Plant Cell*. 7:611-621.

Nover L., Scharf K.D., Gagliardi D., Vergne P., Czarnecka-Verner E. et Gurley W.B. (1996) The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell. Stress. Chap.* 1(4):215-223.

chman H., Gerber A.S. et Hartl D.L. (1988) Genetic applications of an inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics* 120:621-623. Oelmuller R. et Briggs W.R. (1990) Intact plastids are required for nitrate- and light-induced accumulation of nitrate reductase activity and mRNA in squash cotyledons. *Plant. Physiol.* 92 (2):434-439.

Ogata K., Hojo H., Aimoto S., Nakai T., Nakamura H., Sarai A., Ishii S. et Nishimura Y. (1992) Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6428-6432.

Ogata K., Morikawa S., Nakamura H., Sekikawa A., Inoue T., Kanai H., Sarai A., Ishii S. et Nishimura Y. (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*. 79:639-648.

Ogawa K., Shiraishi N., Ida S., Nakagawa H. et Komamine A. (1999) Effects of glutamine on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells. *J. Plant Physiol.* 154(1):46-50.

Ohme-Takagi M. et Shinshi H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell.* 7(2):173-82.

Okamoto P.M., Fu Y.H. et Marzluf G.A. (1991) Nit-3, the structural gene of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: nucleotide sequence and regulation of mRNA synthesis and turnover. *Mol. Gen. Genet.* 227:213-223.

O'Neil K.T., Shuman J.D., Ampe C. et DeGrado W.F. (1991) DNA-induced increase in the alpha-helical content of C/EBP and GCN4. *Biochem.* 30(37):9030-9034.

O'Shea E.K., Klemm J.D., Kim P.S. et Alber T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*. 254(5031):539-544.

ace G.M., Volk R.J. et Jackson W.A. (1990) Nitrate reduction in response to CO<sub>2</sub><sup>-</sup> limited **P** photosynthesis. *Plant Physiol*. 92:286-292.

Palms B. (1995) Clonage, caractérisation et étude de l'expression du gène de la nitrate réductase chez Cichorium intybus L. Thèse de doctorat. Université des sciences et technologies de Lille. 162 p.

Palms B., Goupil P., de Almeida Engler J., Van Der Straeten D., Van Montagu M. et Rambour S. (1996) Evidence for the nitrate-dependent spatial regulation of the nitrate reductase gene expression in chicory roots. *Planta*. 200:20-27.

Pelsy F. et Caboche M. (1992) Molecular genetics of nitrate reductase in higher plants. Adv. genet. 30:1-40.

Perisic O. et Lam E. (1992) A tobacco DNA binding protein that interacts with a light-responsive box II element. *Plant Cell*. 4(7):831-838.

Petosa C., Masters S.C., Bankston L.A., Pohl J., Wang B., Fu H. et Liddington R.C. (1998) 14-3-3 zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J. Biol. Chem.* 273(26):16305-16310.

Pevny L., Simon M.C., Robertson E., Klein W., Tsai S.F., D'Agati V. (1991) Erythroid differenciation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 349:257-260.

Pouteau S., Chérel I., Vaucheret H. et Caboche M. (1989) Nitrate reductase mRNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. *Plant Cell*. 1:111-120.

Prosser I.M. et Lazarus, C.M. (1990) Nucleotide sequence of a spinach nitrate reductase cDNA. *Plant Mol. Biol.* 15:187-190.

Ptashne M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335(6192):683-689.

uesada A., Galvan A. et Fernandez E. (1994) Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii. Plant J.* 5(3):407-419. Quesada A., Krapp A., Trueman L.J., Daniel-Vedèle F., Fernandez E., Forde B.G. et Caboche M. (1997) PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the crnA family. *Plant. Mol. Biol.* 34 (2):265-274.

ajasekhar V.K. et Mohr H. (1986) Appearance of nitrite reductase in cotyledons of the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling as affected by nitrate, phytochrome and photooxydative damage of plastids. *Planta*. 168:369-376.

Rao L.V.M., Datta N., Mahadevan M., Guha-Mukherjee S. et Sopory S.K. (1984) Influence of cytokinins and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. *Phytochem.* 23:1875-1879.

Rastogi R., Bate N.J., Schneiderbauer A., Bowsher C.G., Moffatt B. et Rothstein, S.J. (1993) A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. *Plant J.* 4(2):317-326.

Raven J.A. et Smith F.A. (1976) Nitrogen assimilation and transport in vacular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76:415-431.

Redinbaugh M.C. et Campbell W.H. (1985) Quaternary structure and composition of squash NADH nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* 260:3380-3385.

Riens B. et Heldt H.W. (1992) Decrease of nitrate reductase activity in spinach leaves during a light-dark transition. *Plant. Physiol.* 98 (2):573-577.

Roberts D.M. et Harmon A.C. (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *An. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43:375-414.

Roszak R., Têtu J.F., Slomianny C. et Rambour S. (2000) Effect of endocytotic inhibitors on the transfer of t-dna from *agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *FEBS Lett.* Soumise.

Rouzé P. et Caboche M. (1992) Inducible plant proteins. Nitrate reduction in higher plants: molecular approaches to function and regulation. J.L. Wray Eds (Cambridge: Cambridge University Press). pp 45-77.

Ruberti I., Sessa G., Lucchetti S. et Morelli G. (1991) A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* 10 (7):1787-1791.

Rufty T.W., Thomas J.F., Remmler J., Campbell W.H. et Volk R.J. (1986) Intracellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol*. 82:675-680.

akai H., Medrano L.J. et Meyerowitz E.M. (1995) Role of SUPERMAN in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature*. 378:199-203.

Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, New York.Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samuelson M.E., Campbell W.H. et Larsson C.M. (1995) The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in barley. *Physiol. Plant.* 93:533-539.

Sanchez J. et Heldt H.W. (1990) On the regulation of spinach nitrate reductase. *Plant Physiol*. 92(3):684-689.

Sanger F. (1981) Determination of a nucleotide sequences in DNA. Science. 214:1205-1210.

Santero E., Hoover T. et Kustu S. (1990) Mechanism of transcription from *nif* promoters : involvement of IHF. *In Nitrogen fixation : Achievements and Objectives*. Gresshopff P.M., Roth L.E., Stacey G., Newton W.E. Eds. New York. pp 459-466.

Sato Y., Shiraishi N., Sato T., Ogura N. et Nakagawa H. (1992) Arginine and lysine residues as NADH-binding sites in NADH-nitrate reductase from spinach. *Phytochem*. 31(7):2259-2262.

Scharf K.D., Materna T., Treuter E. et Nover L. (1994) Heat stress promoters and transcription factors. In : *Plant promoters and transcription factors*, L. Nover Eds. Springer Verlag, Berlin. pp 121-158.

Schena M., Lloyd A.M. et Davis R.W. (1993) The HAT4 gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes Dev.* 7:367-379.

Schnorr K.M., Juricek M., Huang C., Culley D. et Kleinhofs A. (1991) Analysis of barley nitrate reductase cDNA and genomic clones. *Mol. Gen. Genet.* 227(3):411-416.

Schondorf T. et Hachtel W.(1995) The choice of reducing substrate is altered by replacement of an alanine by a proline in the FAD domain of a bispecific NAD(P)H-nitrate reductase from birch. *Plant Physiol.* 108(1):203-210.

Schwaerz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H. et Sommer H. (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*. 250:931-936.

Sehnke P.C. et Ferl R.J. (1996) Plant metabolism : enzyme regulation by 14-3-3 proteins. *Curr. Biol.* 6 :1403-1405.

Sessa G., Morelli G. et Ruberti I. (1993) The *Athb*-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J.* 12 (9):3507-3517.

Sessa G., Meller Y. et Fluhr R. (1995) A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the PRB-1b gene. *Plant Mol. Biol.* 28 (1):145-153.

Shen Q. et Ho T.H.D. (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-Box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell*. 7:295-307.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O.et Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.
Shingh K.B., Zhang B., Narasimhulu S.B. et Foley R.C. (1994) Analysis of Ocs-element enhancer sequences and their binding factors. *Results Probl. Cell Differ*. 20:197-207.

Shiraishi N., Sato T., Ogura N. et Nakagawa H. (1992) Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultural spinach cells. *Plant Cell Physiol.* 33:727-731.

Shore P. et Sharrocks A.D. (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229:1-13.

Siddiqi M., Glass A.D.M., Ruth T.J. et Rufty T.W.Jr. (1990) Studies of the nitrate uptake in barley. *Plant Physiol.* 93:1426-1432.

Silver J.D. et Keerikatte V. (1989) Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol.* 63:1924-1928.

Söderman E., Mattsson J., Svenson M., Borkird C. et Engström P. (1994) Expression patterns of novel genes encoding homeodomain leucine-zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26:145-154.

Solomonson L.P. et Barber M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:225-253.

Sommer H., Beltran J.P., Huijser P., Pape H., Lönnig W.E., Saedler H. et Schwarz-Sommer Z. (1990) Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9:605-613.

Sorger G.J., Brown D., Farzannejad M., Guerra A., Jonathan M. et Knight S. (1989) Isolation of a gene down regulates nitrate assimilation and influences another regulatory gene in the same system. *Mol. Cell. Biol.* 9:4113-4117.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.

Srivastava H.S. (1980) Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochem*. 19:725-733.

Srivastava H.S. (1995) In Nitrogen nutrition of higher in Higher plants. Srivastava H.S. et Singh R.P. Eds. Assoc. Publ. Co., New Dehli, pp 145-164.

Strater T. et Hachtel W. (2000) Identification of light- and nitrate-responsive regions of the nitrate reductase promoter from birch. *Plant Sci.* 150:153-161.

Streit L., Nelson R.S. et Harper J.E. (1985) Nitrate reductases from wilde-type and nr1-mutant in soybean leaves. I. Purification, kinetics and physical properties. *Plant Physiol.* 78:80-84.

Streit L., Martin B.A. et Harper J.E. (1987) A method for the separation and partial purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves. *Plant. Physiol.* 84 (3):654-657.

Su W., Huber S.C. et Crawford N.M. (1996) Identification in vitro of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of *Arabidopsis* nitrate reductase. *Plant Cell.* Mar. 8 (3):519-527.

Sueyoshi K., Kubo Y., Yamagishi K., Ogura N., Ochia K., Fukusima K., Ikeda T. et Nakahawa H. (1988) *Plant Cell Physiol.* 29:975-980.

Sueyoshi K., Kleinhofs A. et Warner R.L. (1995) Expression of NADH-specific and NAD(P)H-bispecific nitrate reductase genes in response to nitrate in barley. *Plant Physiol.*. 107 (4):1303-1311.

Sun L., Doxsee R.A., Harel E. et Tobin E.M. (1993) CA-1, a novel phosphoprotein, interacts with the promoter of the cab140 gene in *Arabidopsis* and is undetectable in det1 mutant seedlings. *Plant Cell*. 5 (1):109-121.

Suty L., Moureau T., Leydecker M.T. et Teyssendier de la Serve B. (1993) Cytokinin affects nitrate reductase expression throught the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase mRNA transcript. *Plant Sci.* 90:11-19

Syrett P.J. (1953) The assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. Part I The correlation of assimilation with respiration. *Ann. Bot.* 65:1-19.

Syrett P.J. (1956) The assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. Part IV The dark fixation of carbon dioxide. *Plant Physiol*. 9:165-171.

Syrett P.J. (1988) Uptake and utilization of nitrogen compounds. In *Biochemistry of the Algae* and Cyanobacteria, Eds L.J. Rogers, J.R. Gallon, Oxford. pp 23-29.

abata T., Nakayama T., Mikami K. et Iwabuchi M. (1991) HBP-1a and HBP-1b: leucine zipper-type transcription factors of wheat. *EMBO J.* 10(6):1459-1467.

Takács E. et Técsi L. (1992) Effects of NO3-/NH4+ ration on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Physiol.* 140:298-305.

Takase H., Minami M. et Iwabuchi M. (1991) Sequence-specific single-strand DNA-binding proteins that interact with the regulatory regions of wheat histone H3 and H4 genes. *Biochem. Biophy. Res. Comm.* 176 (3):1593-1600.

Takatsuji, H., Mori M., Benfey P.N., Ren L. et Chua N.H. (1992) Characterization of zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in Petunia petals and seedlings. *EMBO J.* 11:241-249.

Takatsuji H. (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. Cell. Mol. Life Sci. 54:582-596.

Tamaoki M., Tsugawa H., Minami E., Kayano T., Yamamoto N., Kano-Murakami Y. et Matsuoka M. (1995) Alternative RNA products from a rice homeobox gene. *Plant J.* 7 (6):927-938.

Tang P.S. et Wu H.Y. (1957) Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature*. 179:1355-1356.

Tettelin H., Saunders H.J., Heidelber J., Jeffries A.C., Nelson K.E., Eisen J.A., Ketchum K.A., Hood D.W., Peden J.F., Dodson R.J. et al. (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. 287(5459):1809-1815.

Têtu J.F., Roszak R., Leleu O., Crété P., Huss B. et Rambour S. (2000) A rapid method to screen compounds acting on the transfer of the *uidA*-intron gene from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *J. Biotech.* Soumise.

Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim J.T., Münster T., Winter K.U. et Saedler H. (2000) A short hisory of MADS-bos genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42:115-149.

Thompson W.F. et White M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *An. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*42:423-466.

Tijan R. et Maniatis T. (1994) Transcriptional activation : a complex puzzle with few easy pieces. *Cell*. 77:5-8.

Tourraine B., Grignon N. et Grignon C. (1988) Charge balance in  $NO_3^-$  fed soybean. Estimation of kI and carbohydrate recirculation. *Plant Physiol.* 88:605-612.

Tourraine B., Clarkson D.T. et Muller B. (1994) Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. *In a Whole Plant Perspective on carbon nitrogen interactions*. Roy J. et Garnier E. Eds. The Hague, SPB Academic Publishing. pp 11-30.

Treisman R. (1992) Structure and function of serum response factor. In: *Transcriptional regulation*. McKnight S.L. et Yamamoto K.R. Eds. Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. pp 881-905.

Treuter E., Nover L., Ohme K. et Scharf K.D. (1993) Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol. Gen. Genet.* 240 (1):113-125.

Triglia T., Peterson M.G. et Kemp D.J. (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucl. Acids Res.* 16:8186.

Trueman L.J., Richardson A. et Forde B.G. (1996) Molecular cloning of higher plant homologues of the high- affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans. Gene.* 175:223-231.

Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A. et Crawford N.M. (1993) The herbicide sensitive gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*. 72:705-713.

lmasov T., Liu Z.B., Hagen G. et Guilfoyle T.J. (1995) Composite structure of auxin responsive elements. *Plant Cell*. 7:1611-1623.

Ulmasov T., Hagen G. et Guilfoyle T.J. (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*. 276:1865-1868.

Unger E., Parsons R.L., Schmidt R.J., Bowen B. et Roth B.A. (1993) Dominant negative mutants of Opaque2 suppress transactivation of a 22-kD zein promoter by Opaque2 in maize endosperm cells. *Plant Cell.* 5 (8):831-841.

Unkles S.E., Campbell E.I., Punt P.J., Hawker K.L., Contreras R., Hawkins A.R., Van den Hondel C.A.M.J.J. et Kinghorn J.R. (1991) The *Aspergillus niger nia*D gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparaisons. *Gene*. 111:149-155.

Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao S. et Shinozaki K. (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell.* 5 (11) 1529-1539.

ancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L. et Rocha-Sosa M. V(1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250.

Van der Krol A.R. et Chua N.H. (1991) The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell*. 7 (3):667-675.

Varagona M.J., Schmidt R.J. et Raikhel N.V. (1992) Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell*. 4 (10):1213-1227.

Varagona M.J. et Raikhel N.V. (1994) The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J.* 5 (2):207-214.

Vasseur J., Lefebvre R. et Backoula E. (1986) Sur la variabilité de la capacité rhizogène d'explants racinaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof cultivés *in vitro*: influence de la dimension des explants initiaux et de la durée de conservation des racines au froid. *Canad. J. Bot.* 64:243-247.

Vaucheret H., Kronenberger J., Rouzé P. et Caboche M. (1989). Complete nucleotide sequence of the two homeologous tobacco nitrate reductase genes. *Plant Mol. Biol.* 12:597-600.

Vaucheret H., Marion-Poll A., Meyer C., Faure J.D., Marin E. et Caboche M. (1992) Interest in and limits to the utilization of reporter genes for the analysis of transcriptionnal regulation of nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* 235:259-268.

Vaucheret H. et Caboche M. (1995) Induction of nitrate reductase host gene expression has a negative effect on the expression of transgenes driven by the nitrate reductase promoter. *Plant Sci.* 107:95-104.

Vincentz M. et Caboche M. (1991) Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of Nicotiana plumbaginifolia plants. *EMBO J.* 10:1027-1035.

Vincentz M., Moureau T., Leydecker M.T., Vaucheret H. et Caboche M. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves and carbon metabolites. *Plant J.* 3:315-324.

Vogel J.M. Roth B., Cigan M. et Freeling M. (1993) Expression of the two maize TATA binding protein genes and function of the encoded TBP proteins by complementation in yeast. *Plant cell.5* (11):1627-1638.

Vollbrecht E., Veit B., Sinha N. et Hake S. (1991) The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*. 350(6315):241-243.

Vuylsteker C., Leleu O. et Rambour S. (1997) Influence of BAP and NAA on the expression of nitrate reductase in excised chicory roots. *J. Ex. Bot.* 48(310):1079-1085.

arner S.A.J., Scott R. et Draper J. (1993) Isolation of an asparagus intracellulare PR gene (AoPR1) wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterization in transgenic tobacco. *Plant J.* 3:191-201.

Waterhouse R.N., Smyth A.J., Prosper I.M. et Forde B.G. (1994) Cloning and characterization of the nitrate reductase gene in *Lotus japonica* L. Résultats issus des banques de données EMBL/GenBank/DDBJ sous le numéro d'accès X80670.

Weigel D. et Meyerowitz E.M. (1994) The ABCS of floral homeotic genes. Cell. 78:203-209.

Weigel D. (1995) The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *Plant cell*. 7 (4):388-389.

Weiss M.A., Ellenberger T., Wobbe C.R., Lee J.P., Harrison S.C. et Struhl K. (1990) Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature*. 347:575-578.

Wilkinson J.Q. et Crawford N.M. (1991) Identification of the *Arabidopsis* CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2. *Plant Cell*. 3:461-471.

Wilkinson J. Q. et Crawford N.M. (1993) Identification and characterization of a chlorateresistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol. Gen. Genet.* 239:289-297.

Williams R.S.B., Davis M.A. et Howlett B.J. (1994) Nitrate reductase of the ascomycetous fungus, *Leptosphaeria maculans*: gene sequence and chromosomal location. *Mol. Gen. Genet.* 244:1-8.

Wissenbach M., Uberlacker B., Vogt F., Becker D., Salamini F. et Rohde W. (1993) Myb genes from *Hordeum vulgare*: tissue-specific expression of chimeric Myb promoter/Gus genes in transgenic tobacco. *Plant. J.* 4 (3): 411-422.

Wu S., Lu Q., Kriz A. L. et Harper J. E. (1995). Identification of cDNA clones corresponding to two inducible nitrate reductase genes in soybean: analysis in wild-type and *nr*1 mutant. *Plant Mol. Biol.* 29:491-506.

iao B., Smerdon S.J., Jones D.H., Dodson G.G. et Soneji Y. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signaling pathways. *Nature*. 376:188-191.

amazaki K., Katagiri F., Imaseki H. et Chua N. (1990) TGA1a, a tobacco DNA-binding protein, increases the rate of initiation in a plant in vitro transcription system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (18):7035-7039.

Yanoksky M.F., Ma H., Bowman J.L., Drews G.N., Feldman K.A. et Meyerowitz E.M. (1990) The protein encoded by the *Arabidospsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*. 346:35-39.

Yu X.D., Sukumaran S. et Marton L. (1998) Differential expression of the *Arabidopsis Nia*1 and *Nia*2 genes - Cytokinin-induced nitrate reductase activity is correlated with increased *Nia*1 transcription and mRNA levels. *Plant Physiol.* 116(3):1091-1096.

Yuan G.F., Fu Y.H. et Marzluf G.A. (1991) Nit-4, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 11:5735-5745.

Yubiushi T., Naitoh Y., Zenno S., Tamura M., Takeshita M. et Sakaki Y. (1987) Molecular cloning of cDNAs of human liver and placenta NADH-cytochrome b5 reductase. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 84:3609-3613.

hang H. et Forde G. (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrientinduced changes in root architecture. Science. 279:407-409.

Zhang H. et Forde G. (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. J. Ex. Bot. 51(342):51-59.

Zhu Q., Chappell J., Hedrick S.A. et Lamb C. (1995) Accurate *in vitro* transcription from circularized plasmid templates by plant whole extracts. *Plant J.* 7:1021-1030.

Zhuo D., Okamoto M., Vidmar J.J. et Glass A.D.M. (1999) Regulation of a putative highaffinity nitrate transporter (Nrt2;At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 17(5):563-568.



Symbole	Code 3c	Acide aminé	Codons
A	Ala	Alanine	GCT GCC GCA GCG
B	Asp Asn	Acide aspartique Asparagine	GAT GAC AAT AAC
С	Cys	Cystéine	TGT TGC
D	Asp	Acide aspartique	GAT GAC
E	Glu	Acide glutamique	GAA GAG
F	Phe	Phénylalanine	TTT TTC
G	Gly	Glycine	GGT GGC GGA GGG
H	His	Histidine	CAT CAC
Ι	Ile	Isoleucine	ATT ATC ATA
K	Lys	Lysine	AAA AAG
L	Leu	Leucine	TTG TTA CTT CTC CTA CTG
M	Met	Méthionine	ATG
N	Asn	Asparagine	AAT AAC
Р	Pro	Proline	CCT CCC CCA CCG
Q	Gln	Glutamine	CAA CAG
R	Arg	Arginine	CGT CGC CGA CGG AGA AGG
S	Ser	Sérine	TCT TCC TCA TCG AGT AGC
Τ	Thr	Thréonine	ACT ACC ACA ACG
V	Val	Valine	GTT GTC GTA GTG
W	Trp	Tryptophane	TGG
X	Xxx	Inconnu	XXX
Y	Tyr	Tyrosine	TAT TAC
Ζ	Glu	Acide glutamique	GAA GAG CAA CAG
	Gln	Glutamine	

ANNEXE I : Le code des acides aminés et nucléotides

Isolation of *Cichorium intybus* L. nitrate reductase promoter. Investigation in transcription DES SC. factors involved in nitrate reductase regulation under different nitrogen nutrition.

## Abstract:

Nitrate reductase (NR) catalysing the reduction of nitrate to nitrite is the first enzyme in the assimilation of nitrate by plants. In order to study molecular regulation of *Cichorium intybus* NR, we attempt to isolate the NR promoter. Whilst the classical method of isolating a gene is the screening of a genomic library, the IPCR technique provides a novel alternative approach. A 932 bp fragment was isolated. Sequence alignment of chicory NR promoter and other higher plants NR promoters shows a conserved stretch (ATG/IT/TATA). Computer analysis shows that there are three TATC sequences, motive of the binding site for NIT2 of *Neurospora crassa*. We have constructed a chimaeric *UidA* gene driven by the chicory NR promoter. Transformation, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, permitted the obtention of six transformed plants. One of these transformants shows a strong regulation of  $\beta$ -glucuconidase activity by nitrate. This regulation gives a good evidence of the functionality of the cloned promoter.

We showed that chicory suspension cell culture is a good model for studying NR regulation by nitrate. So, in order to confirm the results obtained with stable transformants, we developed a technique based on the detection of GUS activity in microtiter plates on a transformed cell suspension culture with agrobacteria containing the p*nia:UidA* construct. The first results obtained confirm the regulation of  $\beta$ -glucuronidase activity by nitrate.

In order to isolate transcription factors involved in the nitrate transduction pathway, nuclear proteins from suspension cells were isolated and separated by 2D electrophoresis. Seven sequenced peptides (from protein N°2) show strong homology with an *Escherichia coli* protein, NARQ. Surprisingly, a sequenced stretch, Ala - Ser – Ser – (Asp/Asn) – Gln – Glu – Phe, is not found in NARQ. Moreover, that stretch is not found in other known proteins.

Electrophoretic mobility shift assays were performed with 5 fragments of NR promoter. One of these (n°II, 145 bp) was shown to bind 4 nuclear proteins when nuclear extracts were prepared with suspension cells grown with nitrate.

Key-words: Nitrate reductase – Promoter – Transcription factor – Cichorium intybus – I-PCR.