

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 27 (1996)

Artikel: Modifications du profil de phosphorylation des protéines nucléaires à la suite d'une stimulation mécanique chez *Lycopersicon esculentum*
Autor: Diogon, Thierry / Thonat, Catherine / Boyer, Nicole
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099114>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 17.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Modifications du profil de phosphorylation des protéines nucléaires à la suite d'une stimulation mécanique chez *Lycopersicon esculentum*

THIERRY DIOGON
CATHERINE THONAT
& NICOLE BOYER

ABSTRACT

DIOGON, T., C. THONAT & N. BOYER (1996). Nuclear protein phosphorylation pattern modifications induced by a mechanical stimulation in *Lycopersicon esculentum*. *Saussurea* 27: 29-39. In French, English and French abstracts.

A mechanical stimulation applied by rubbing young internodes leads to an inhibition of the elongation and a stimulation of the radial expansion. This stress response of plants was described as thigmomorphogenesis. This work allowed us to initiate research about the early events which are induced in the nucleus by a stimulation. Studies concerning the nuclear biochemical functions pointed out the importance of the phosphorylation/dephosphorylation systems and the calcium concentration, for their regulations. Thus, we studied the effect of calcium on these nuclear systems and the modifications of the kinase and phosphatase activities which occur after a stimulation. Preliminary results clearly show a modification of the nuclear protein phosphorylation pattern induced by a mechanical stimulation and demonstrate the existence of various regulation systems for these reactions.

RÉSUMÉ

DIOGON, T., C. THONAT & N. BOYER (1996). Modifications du profil de phosphorylation des protéines nucléaires à la suite d'une stimulation mécanique chez *Lycopersicon esculentum*. *Saussurea* 27: 29-39. En français, résumés en français et anglais.

Une irritation tactile appliquée sous forme de frottements à de jeunes entre-noeuds, provoque une inhibition de la croissance longitudinale et une stimulation de la croissance radiale. Cette réponse des plantes à des stimulations mécaniques a été qualifiée de thigmomorphogenèse. Ce travail nous a permis d'initier des recherches concernant les événements précoces qui se produisent dans le noyau, après une stimulation. Des études relatives aux fonctions biochimiques nucléaires montrent l'importance des systèmes de phosphorylation /déphosphorylation et de la concentration des ions calciques pour leurs régulations. Nous avons donc étudié l'effet du calcium sur ces systèmes nucléaires ainsi que les modifications des activités kinases et phosphatases, suite à une stimulation. Des résultats préliminaires montrent clairement une modification du profil de phosphorylation des protéines nucléaires à la suite d'une stimulation mécanique, ainsi que l'existence de différents systèmes de régulation de ces réactions.

Introduction

Lors d'études sur la croissance de plantes grimpantes, notamment de la Bryone (*Bryonia dioica*), une expérimentation précise a montré que suite à l'application de frottements sur un jeune entre-nœuds, ce dernier montrait une inhibition de sa croissance longitudinale, corrélée avec une lignification précoce des cellules, et une augmentation de sa croissance radiale (BAILLAUD, 1967; BOYER, 1967; BOYER & al., 1979b). La réponse des plantes à des stimulations mécaniques a été qualifiée de thigmomorphogénèse (JAFFE, 1973).

Les premières études sur cette réponse ont montré un rôle important des hormones: on observe à la suite d'un signal, une diminution des teneurs en auxines, hormones connues pour promouvoir l'expansion cellulaire. Parallèlement, une augmentation des activités des peroxydases basiques jouerait le rôle d'auxine-oxydases (BOYER & al., 1979b) et une flambée d'éthylène serait capable d'inhiber la croissance cellulaire au profit de l'expansion radiale, en relation avec une augmentation des activités de l'ACC synthase et de l'ACC oxydase, enzymes impliquées dans le métabolisme de l'éthylène. D'autre part, les activités de la PAL et des peroxydases acides liées au plasmalemme, enzymes impliquées dans la lignification, sont stimulées.

Lors de ces études, il a été montré que le calcium avait un rôle primordial dans cette réponse: en effet, si les plantes sont préalablement traitées avec de l'EGTA, un composé chélateur des cations bivalents, il n'est plus observé de réponse thigmomorphogénétique: le rôle du calcium dans cette réponse semble important (BOYER & al., 1979a, 1983; BOYER & DE JAEGHER, 1986 ; DE JAEGHER & al., 1985, 1987, 1990).

Des études plus poussées ont été ciblées sur les événements précoces découlant de la stimulation mécanique. Il est maintenant admis qu'un stimulus externe induit une augmentation rapide et transitoire de la concentration du Ca^{2+} libre dans le cytoplasme (LESHEM, 1987; FERGUSON & DROBACK, 1988). Quoi qu'il en soit, cette augmentation est fortement prouvée par l'action d'un grand nombre d'enzymes Ca^{2+} /calmoduline dépendantes. D'autre part, l'existence d'un grand nombre de systèmes maintenant l'homéostasie du Ca^{2+} libre dans le cytoplasme à un niveau très bas (ATPases calciques, antiports, diffusion facilité...) semble conforter son intervention en tant que messenger secondaire dans la transduction des signaux (BOURGEADE & al., 1991; BOURGEADE & BOYER, 1994 ; BUSH, 1993). Récemment, il a été montré que 30 secondes après une stimulation, il y avait une délocalisation des ions Ca^{2+} liés à la membrane (THONAT & al., 1993). Dès la disparition du calcium lié aux membranes, on observe une augmentation de la teneur en calmoduline active dans le cytoplasme, ce qui indique que la concentration cytoplasmique de cet ion a augmenté (une molécule de calmoduline fixe quatre ions calciques). Parallèlement, on observe une augmentation de la fluidité membranaire, en partie due à cette délocalisation des ions Ca^{2+} qui ont un rôle rigidifiant, mais aussi en raison d'une modification de la composition en phospholipides du plasmalemme (MATHIEU & al., 1995). Cette augmentation rapide et transitoire de la concentration cytosolique en Ca^{2+} (1 minute et 30 secondes plus tard, on observe un retour à l'état initial) permettrait l'activation de la voie des inositides phosphates qui conduira à la libération des réserves subcellulaires de Ca^{2+} (BERRIDGE & IRVINE, 1984; KUROSAKI & al., 1987; MORSE & al., 1987; RANJEVA & al., 1988). La première augmentation de la teneur en ions Ca^{2+} libres activerait la phospholipase C (fig. 1) qui catalyse le métabolisme du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, en diacylglycérol (DG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3): le DG reste dans la membrane et activerait

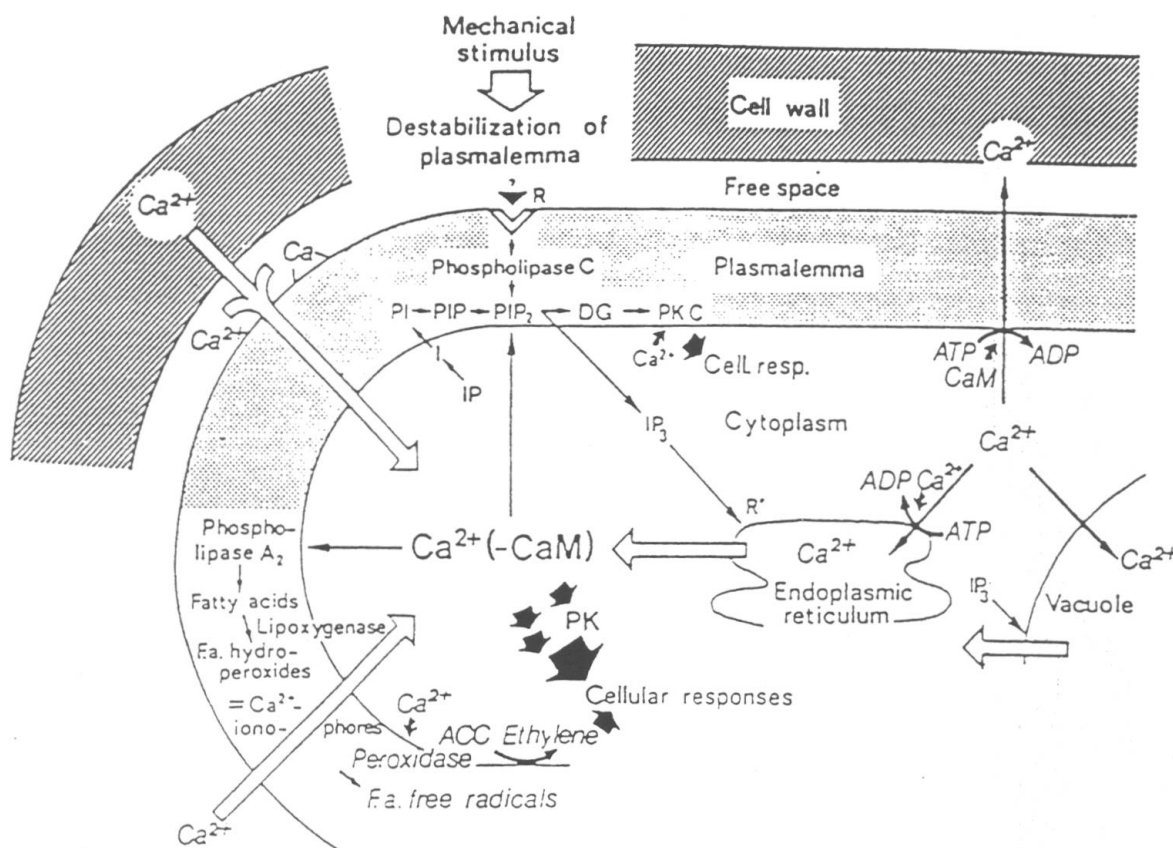


Fig. 1. – Modèle proposé pour décrire l'intervention du calcium dans la transduction du stimulus mécanique (DE JAEGER & BOYER, 1990).

ACC: Acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique; CaM: calmoduline; DG: diacylglycérol; Fa: Acides gras; I: myo-inositol; IP: inositol 1-phosphate; IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate; PI: phosphatidylinositol; PIP: phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-diphosphate; PK: protéines kinases; PKC: protéine kinase C; R et R': récepteurs

des protéines kinases membranaires Ca²⁺/phospholipides dépendantes, comme la protéine kinase C, et l'IP₃ libéré dans le cytoplasme se fixe sur des récepteurs vacuolaires ou réticulaires provoquant l'ouverture de canaux calciques (BERRIDGE, 1985). Cette suite de réactions conduit à une amplification du signal initial, donc à une augmentation transitoire plus importante des teneurs en Ca²⁺ libre et en calmoduline active dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau (BACHS & al., 1992), qui vont permettre l'activation d'enzymes Ca²⁺/calmoduline dépendantes.

Au niveau nucléaire, une demi-heure après la stimulation mécanique, on observe une diminution du taux de méthylation de l'ADN, qui revient à son niveau initial (soit environ 25% des cytosines méthylées), trois heures plus tard (GALAUD & al., 1993a, b). La méthylation de l'ADN semble jouer un rôle important dans l'expression du génome; de ce fait, cette diminution puis le retour au niveau initial, pourrait déréguler transitoirement des gènes qui permettront par la suite, la réponse thigmomorphogénétique, ou bien l'activité synthétique du génome pourrait être reprogrammée lors de ce phénomène (BRAAM & DAVIS, 1990). Si les plantes sont traitées avec un chélateur des cations bivalents (EGTA), aucune diminution du taux de méthylation n'est observée: il y a donc une réponse au niveau du noyau, de l'augmentation de la concentration

cytosolique du calcium libre. La réponse nucléaire pourrait être la conséquence de la modification de l'activité de kinases et de phosphatases (activées ou inhibées), dépendantes du calcium et/ou de la calmoduline. En effet, les réactions de phosphorylation/déphosphorylation constituent une étape importante dans les régulations de nombreux processus biologiques: de nombreuses enzymes sont inhibées ou activées par des phosphorylations ou des déphosphorylations et l'équilibre de ces réactions est fortement modulé en fonction du calcium libre. En ce qui concerne le noyau, RANJEVA & BOUDET, en 1987, ont publié une synthèse des réactions nucléaires de phosphorylation connues chez les plantes. De nombreux auteurs travaillant sur des matériels différents ont montré que le système de régulation des cycles cellulaires était contrôlé par une cascade de protéines kinases. Plus spécifiquement, ces réactions interviennent aussi dans la régulation des principaux processus biologiques du noyau, qui sont d'une part la transcription de l'ADN en ARN et d'autre part, la réplication de l'ADN, préalable à la division cellulaire. Une des premières données concernant les phosphorylations des protéines nucléaires a été l'observation d'une modification de l'état de phosphorylation de la chromatine suite à différents traitements hormonaux (CHAPMAN & al., 1975; VAN LOON & al., 1975). Plus tard, il a été confirmé que la phosphorylation de protéines non-histones associées à l'ADN était impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes (MURRAY & KEY, 1978; WIEGLAT & KLECZKOWSKI, 1981): des protéines kinases sont activées en même temps que les ARN polymérases. D'autre part, la phosphorylation des histones, protéines qui stabilisent la molécule d'ADN, diminue fortement les interactions protéines/ADN (STRATTON & TREWAVAS, 1981; MELANSON & TREWAVAS, 1982): lors de la réplication, les histones sont fortement phosphorylées, donc les DNA polymérases ont un accès facilité aux molécules d'ADN.

Selon BUDDE & RANDALL (1990), la transduction des signaux externes est typiquement une chaîne de quatre événements successifs:

- la présence du signal généré à l'extérieur de la cellule (signal environnemental, hormonal...)
- le couplage de la transduction du signal avec les effecteurs ou seconds messagers intracellulaires, tels que le calcium, mais aussi les phospholipides ou les polycations (Mg^{2+} , Mn^{2+}) qui peuvent réguler l'état de phosphorylation des protéines
- des changements de l'état de phosphorylation des substrats protéiques cibles; l'état de phosphorylation d'une protéine reflète les activités relatives de la kinase et de la phosphatase qui catalysent les processus d'interconversion. Il y a modification de l'état témoin par le second messenger en modulant l'une ou l'autre des activités
- la modification de l'activité enzymatique ou de la fonction de la protéine cible, avec un changement important de la biochimie cellulaire et de sa physiologie.

Ce sont quatre étapes qui amplifient chacune plusieurs fois le signal d'origine.

Dans ce travail, en ce qui concerne les événements thigmomorphogénétiques, nous nous sommes intéressés principalement à la troisième étape de cette chaîne.

Matériel et méthodes

L'espèce étudiée au laboratoire dans le cadre de cette étude est la tomate (*Lycopersicon esculentum* var. *Supermarmanda*). Les plantes sont cultivées dans les conditions suivantes:

- Température: $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Humidité: 60 à 80%
- Photopériode: jour: 16 heures, nuit: 8 heures
- Intensité lumineuse: 18 W/m^2

Le stimulus mécanique est donné au niveau du dernier entre-nœuds dégagé du bourgeon terminal: il consiste à faire glisser les doigts entre deux nœuds, trois fois en un mouvement de va-et-vient.

La purification des noyaux s'inspire des techniques de SUZUKI & VERMA (1990) et de CHIATANTE & al. (1990). Les jeunes entre-nœuds sont prélevés avec une lame de rasoir et tout de suite stockés dans l'azote liquide. Ils sont broyés dans l'azote liquide et repris dans le tampon A (MES, pH 6.0, 10 mM; Sucrose, 0.25 M; NaCl, 10 mM, EDTA, 20 mM; β ME, 20 mM; Spermine, 0.15 mM; Spermidine, 0.5 mM; PMSF, 0.2 mM; Triton X-100, 0.6%) à raison de 5 ml de tampon par gramme de matière fraîche. La suspension est ainsi incubée pendant 30 minutes sous agitation douce, puis elle est filtrée sur une toile à bluter fine (40 μm). La suspension est centrifugée à 1500 g pendant 10 minutes, le culot est repris dans un petit volume de tampon A et la suspension est de nouveau centrifugée pendant le même temps à la même vitesse. L'opération a pour but d'éliminer les chloroplastes (elle est renouvelée s'il en reste après la deuxième centrifugation). Le culot final est repris dans 1 ml de tampon A, **5 fois concentré** et est mélangé à 9 ml de Percoll®. Après une centrifugation de 5 minutes à 2000 g sur un rotor à angle libre, les noyaux forment un coussin en surface. Les noyaux sont repris dans du tampon A à 80% de Percoll®. Après centrifugation 10 minutes à 2000 g, les noyaux se retrouvent dans le fond du tube. Ceux-ci sont repris et lavés dans du tampon A seul (centrifugation 5 minutes à 1500 g).

Le comptage des noyaux est effectué au microscope à fluorescence après coloration à l'acridine orange (coloration 15 minutes dans du tampon Krebs-Ringer à 10% d'acridine orange). Les noyaux ainsi obtenus peuvent être conservés dans du tampon A avec 30% de glycérol, à -80°C . Avant leur utilisation, les noyaux sont lavés dans du tampon A.

Pour les essais de phosphorylation, la technique utilisée est une adaptation de celle de CHIATANTE & al. (1990): les noyaux ($\sim 5 \cdot 10^6$) sont repris dans 45 μl de tampon B (MES-Tris, pH 7.0, 25 mM; Sucrose, 0.25 M; DTT, 1 mM; EGTA, 0.25 mM) contenant soit du NaF, un inhibiteur des phosphatases, à 1 mM, soit de la Trifluoropérazine (TFP), un inhibiteur de la calmoduline active, soit du CaCl_2 , en concentrations variables suivant les expériences. L'ATP nécessaire aux réactions de phosphorylation est ajouté sous forme d'ATP- γ - ^{32}P , à une concentration finale de 100 μM , avec une activité de 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$: 5 μl d'une solution mère **10 fois concentrée**, contenant 50 mM de MnCl_2 sont ajoutés au milieu réactionnel. Les noyaux sont ensuite soniqués pendant une minute et l'incubation dure 15 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite 20 μl de tampon de solubilisation (Tris-HCl, pH 6.8, 0.5 M; 20% glycérol; 10% β ME; 6% SDS) pour arrêter l'essai de phosphorylation. Les différents essais sont chargés sur un SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Pour réaliser l'autoradiographie, le gel est placé sur du papier Whatman et scellé hermétiquement dans une poche en plastique. Le tout est placé au contact d'un film Kodak RX pendant 2 à 5 jours suivant l'activité résiduelle dans le gel.

Résultats – Discussion

Avant toute interprétation, il faut garder à l'esprit le principe de ces réactions. Quand un essai de phosphorylation est effectué sans NaF, on observe un équilibre des activités kinases et phosphatases en fonction des différents effecteurs (CaCl_2 , TFP). Dans le cas des essais réalisés en présence de NaF, les activités phosphatases sont inhibées, donc une protéine déjà fortement phosphorylée au préalable ne pourra incorporer du phosphate radioactif lors de l'essai de phosphorylation, même si «sa» kinase est activée: seules des protéines non phosphorylées avant l'expérience pourront être visualisées par le marquage radioactif si les kinases sont activées par un des effecteurs.

Autoradiographie 1 (fig. 2)

La première chose visible est que les phosphorylations sont fortement activées par la présence du calcium, mais aussi par la calmoduline: dans les profils provenant d'extraits traités au CaCl_2 , sans inhibiteur de la calmoduline ni EGTA (puits 3 et 6), on observe le plus fort taux de phosphorylation. De nombreuses bandes disparaissent dans les extraits traités avec l'EGTA (puits 1 et 4) et avec la TFP (puits 2 et 5): ceci démontre de nombreuses activités kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes.

Dans l'extrait traité avec le CaCl_2 et le NaF (puits 6), on observe une légère diminution de l'incorporation des phosphates et surtout l'apparition d'une bande (d'environ 32 kDa) par rapport à l'extrait sans NaF (puits 3), ce qui semble indiquer l'existence d'une activité phosphatase, plus forte que l'activité kinase correspondante. Toujours concernant la bande au même poids moléculaire, mais dans les autres pistes, le marquage est plus marqué, à la fois dans les extraits contenant de l'EGTA (puits 1 et 4) ou de la TFP (puits 2 et 5), avec ou sans NaF. Ceci indique que (1) à l'origine cette protéine était faiblement phosphorylée, (2) la kinase qui phosphoryle cette protéine est insensible aux variations de la concentration en Ca^{2+} libre.

D'autre part, dans les extraits traités avec l'EGTA (puits 1 et 4), on peut remarquer qu'une bande de faible poids moléculaire (environ 9 kDa) disparaît: ceci démontre une activité kinase Ca^{2+} dépendante, mais calmoduline indépendante, car la phosphorylation a lieu aussi en présence de la TFP (puits 2 et 5). Pour finir, les extraits traités avec l'EGTA montrent la disparition d'une bande de très faible poids moléculaire (environ 8 kDa) dans l'extrait sans NaF (puits 1), ce qui démontre une activité phosphatase indépendante du calcium et de la calmoduline.

Ces résultats prouvent l'existence:

- d'activités phosphatases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes
- d'activités phosphatases Ca^{2+} /calmoduline indépendantes
- d'activités kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes
- d'activités kinases Ca^{2+} /calmoduline indépendantes
- d'activités kinases Ca^{2+} dépendantes mais calmoduline indépendantes.

Autoradiographie 2 (fig. 3)

En ce qui concerne la comparaison des profils issus d'entre-nœuds témoins et stimulés sans NaF (respectivement, les puits 2 et 4), on n'observe que de faibles variations, concernant uniquement l'intensité des bandes, mais pas d'apparition ou de disparition de bande: ceci semble normal, car quelle que soit la situation d'origine, les

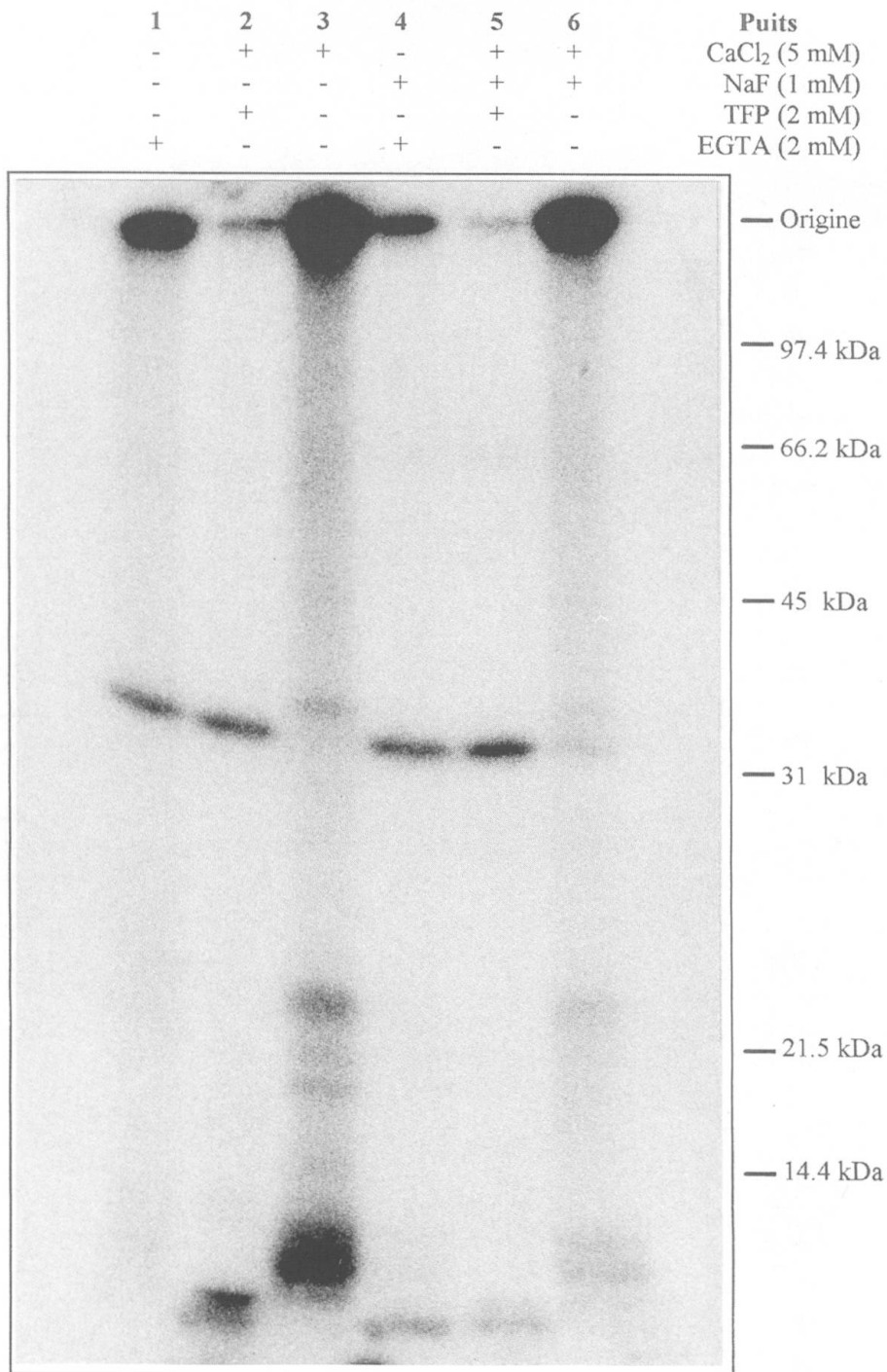


Fig. 2. – Autoradiographie obtenue à partir d'un SDS-PAGE effectué à la suite d'un essai de phosphorylation. Cette expérience a été réalisée avec des noyaux extraits d'entre-nœuds témoins. **Puits 2, 3, 5 et 6:** + 5 mM de CaCl₂; **Puits 1 et 4:** + 2 mM d'EGTA; **Puits 2 et 5:** + 2 mM de TFP; **Puits 4 à 6:** + 1 mM de NaF.

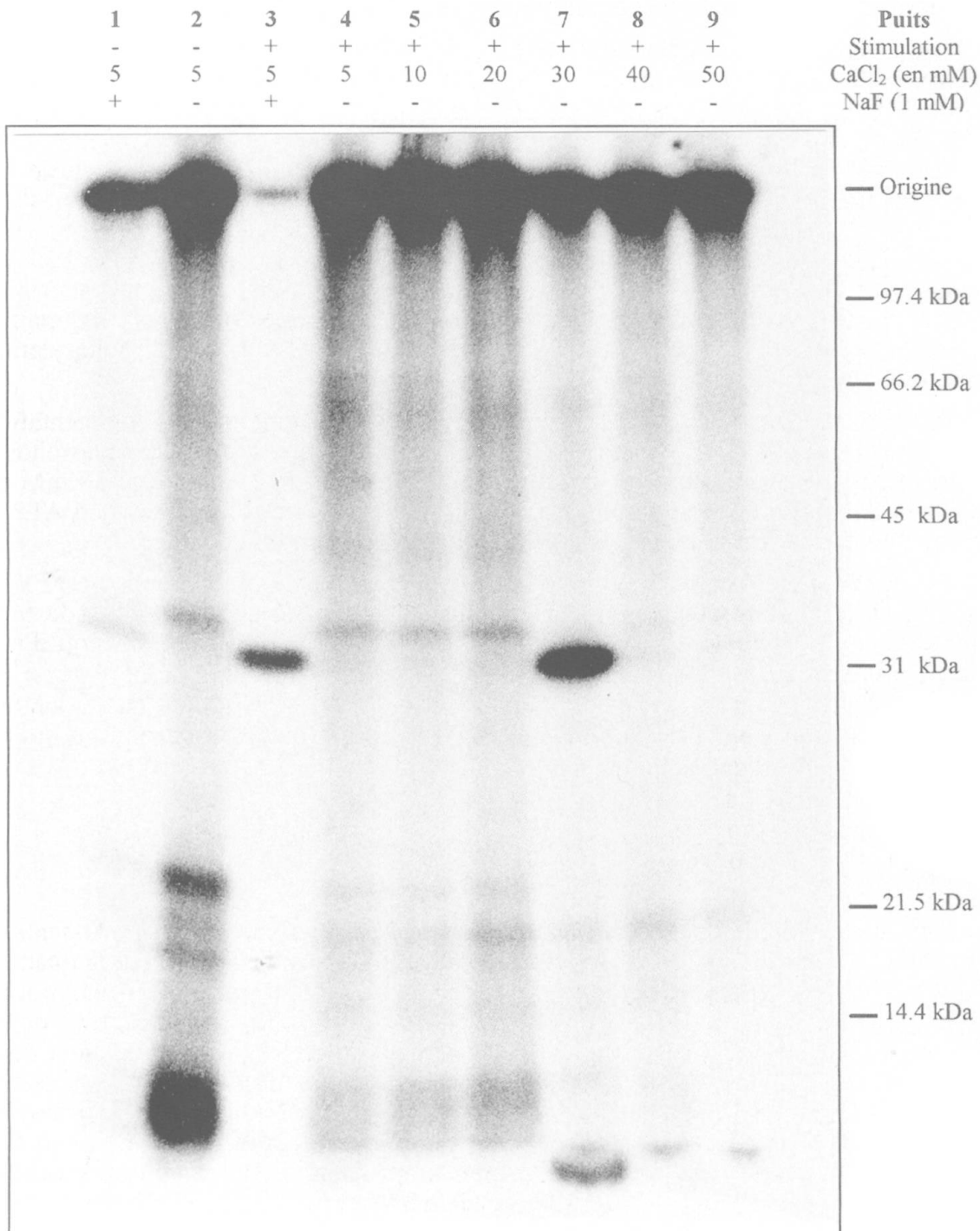


Fig. 3. – Autoradiographie obtenue à partir d'un SDS-PAGE effectué à la suite d'un essai de phosphorylation. Cette expérience permet de visualiser d'une part les différences de phosphorylation qui peuvent se produire à la suite d'une stimulation mécanique et d'autre part, les variations observables suivant la concentration en ions calciques. Les *essais 1, 2* sont réalisés à partir de noyaux extraits d'entre-nœuds témoins; les *essais 3 à 9* sont réalisés à partir de noyaux extraits d'entre-nœuds ayant subi une stimulation mécanique (prélèvements 30 minutes après la stimulation). Les *essais de 1 à 4* sont réalisés en présence de 5 mM de CaCl₂; les *essais 2 et 4*, avec 1 mM de NaF. Les *essais de 5 à 9* sont réalisés en présence respectivement de 10, 20, 30, 40 et 50 mM de CaCl₂.

noyaux se trouvent dans les mêmes conditions et sans inhibiteur des phosphatases, il est donc normal d'arriver au même équilibre.

Par contre, dans le cas des essais en présence de NaF (les puits 1 et 3), le profil de phosphorylation dépend totalement de la situation de départ, c'est-à-dire de l'état de phosphorylation des protéines au début de l'expérience. Dans ce cas, on observe une différence très nette: l'essai réalisé à partir d'entre-nœuds stimulés (puits 3) ne présente qu'une bande fortement marquée (d'environ 32 kDa), ce qui indique que toutes les autres protéines marquées dans les autres profils étaient déjà phosphorylées avant l'expérience et, par conséquent, la bande fortement marquée indiquerait une protéine (ou plusieurs de même poids moléculaire) fortement déphosphorylée à la suite du signal. En résumé, la stimulation mécanique provoque la phosphorylation d'au moins sept protéines (si on considère le nombre de bandes majeures présentes sur les profils, mais il peut exister plusieurs protéines de mêmes poids moléculaires) et la déphosphorylation d'au moins une protéine.

Si l'on considère maintenant les variations du profil en fonction de l'augmentation de la concentration en CaCl_2 (puits 4 à 9), on note une légère inhibition des phosphorylations aux fortes concentrations (profils plus clairs en général, à partir de 30 mM de CaCl_2): ceci serait un effet saturant du calcium, qui stabiliserait la molécule d'ATP et impliquerait que la réaction nécessiterait plus d'énergie pour être réalisée.

Par contre, l'événement le plus surprenant est l'apparition de la bande de 32 kDa pour une concentration donnée en CaCl_2 (puits 7): il semble que l'équilibre de cette réaction ne dépende pas uniquement de la présence ou non du calcium, mais qu'il soit sensible à une concentration précise: à 30 mM de CaCl_2 , l'équilibre de la réaction est fortement déplacé vers la phosphorylation, alors que dans les autres cas, pour des concentrations supérieures ou inférieures (sans NaF), c'est la déphosphorylation qui est favorisée.

Conclusion et perspectives

Dans un premier temps, il serait important de déterminer avec précision la quantité de Ca^{2+} libre présente lors des essais dans les milieux réactionnels: en effet, la quantité de CaCl_2 n'est pas le reflet exact de cette quantité et il ne faut pas oublier que tout au long de l'extraction et des essais de phosphorylation, il y a toujours une certaine quantité non négligeable d'EGTA, qui chélate les cations bivalents. Pour déterminer cette quantité, il existe de nombreux logiciels de calcul, suivant les différents composants d'un milieu, mais il est difficile d'intégrer les noyaux eux-mêmes et leurs constituants qui pourraient influencer sur la quantité de Ca^{2+} libre. Pour être sûr de la teneur en ions calcium, il faudrait utiliser une sonde à calcium et étant donné le faible volume réactionnel ainsi que la présence de radioactivité, cette opération reste encore délicate.

Il serait important aussi d'effectuer de nouveau les mêmes expériences mais cette fois en utilisant la technique des gels à deux dimensions pour obtenir une meilleure résolution: la séparation d'une part, suivant le point isoélectrique et d'autre part suivant le poids moléculaire pourrait lever l'incertitude persistant sur l'existence d'une ou plusieurs protéines au niveau d'une bande donnée sur un SDS-PAGE.

Enfin, une fois l'analyse faite en gel à deux dimensions, il serait intéressant d'effectuer des microséquençages sur les protéines dont l'état de phosphorylation varie suite à la stimulation mécanique et/ou en fonction de la concentration de calcium, pour

avoir une idée de la nature de ces protéines, ainsi que des implications physiologiques de ces phosphorylations.

RÉFÉRENCES

- BACHS, O., N. AGELL & E. CARAFOLI (1992). Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 259-270.
- BAILLAUD, L. (1967). Variation d'une périodicité endogène normalement circadienne affectant le dégagement des entre-nœuds de la Bryone, *Bryonia dioica*, en fonction des facteurs agissant sur la vitesse de croissance. *Z. Pflanzenphysiol.* 57: 203-205.
- BERRIDGE, M. (1985). Les molécules de la communication dans la cellule. *Pour la Science*, déc. 1985, 134-146.
- BERRIDGE, M. & R. IRVINE (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.
- BOURGEADE, P. & N. BOYER (1994). Plasma membrane H⁺-ATPase activity in response to mechanical stimulation of *Bryonia dioica* internodes. *Pl. Physiol. Biochem.* 32: 661-668.
- BOURGEADE, P., G. DE JAEGHER & N. BOYER (1991). Microsomal ATP-dependent Ca²⁺ transport is affected by environmental stress in *Bryonia dioica* internodes. *Pl. Sci.* 79: 23-30.
- BOYER, N. (1967). Modification de la croissance de la tige de Bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *Compt. Rend. Séances Acad. Sci. Paris* 264: 2114-2117.
- BOYER, N., B. CHAPPELLE & T. GASPAR (1979a). Lithium inhibition of thigmomorphogenetic response in *Bryonia dioica*. *Pl. Physiol.* 63: 1215-1216.
- BOYER, N. & G. DE JAEGHER (1986). Direct or indirect role of peroxidases in ethylene biosynthesis? In: GREPPIN, H., C. PENEL & T. GASPAR (éds.), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*: 47-60. Université de Genève.
- BOYER, N., M.-O. DESBIEZ, M. HOFINGER & T. GASPAR (1983). Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*. Ethylene production and sensitivity. *Pl. Physiol.* 72: 522-525.
- BOYER, N., T. GASPAR & M. LAMOND (1979b). Modifications des isoperoxydases et de l'allongement des entre-nœuds de Bryone à la suite d'irritations mécaniques. *Z. Pflanzenphysiol.* 93: 459-470.
- BRAAM, J. & R.-W. DAVIS (1990). Rain-, wind- and touch induced expression of calmodulin related genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60: 357-364.
- BUDDE, R. & D. RANDALL (1990). Light as a signal influencing the phosphorylation status of plant proteins. *Pl. Physiol.* 94: 1501-1504.
- BUSH, D. (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Pl. Physiol.* 103: 7-13.
- CHAPMAN, K., A. TREWAVAS & L. VAN LOON (1975). Regulation of the phosphorylation of chromatin-associated proteins in *Lemna* and *Hordeum*. *Pl. Physiol.* 55: 293-296.
- CHIATANTE, D., P. BRUSA, M. LEVI, S. SGORBATI & E. SPARVOLI (1990). A simple protocol to purify fresh nuclei from milligram amounts of meristematic pea root tissue for biochemical and flow cytometry applications. *Physiol. Pl.* 78: 501-506.
- DE JAEGHER, G. & N. BOYER (1987). Specific inhibition of lignification in *Bryonia dioica*. Effects on thigmomorphogenesis. *Pl. Physiol.* 84: 10-11.
- DE JAEGHER, G. & N. BOYER (1990). On the role of membrane and calcium in signal perception and transduction on thigmomorphogenesis of *Bryonia dioica*. In: MILLET, B. & H. GREPPIN (éds.), *Intra- and Extracellular Communications in Higher Plants: Reception, Transmission, Storage and Expression of Messages*: 29-39. I.N.R.A., Paris.
- DE JAEGHER, G., N. BOYER, M.-C. BON & T. GASPAR (1987). Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: early events in ethylene biosynthesis pathway. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 182: 19-52.
- DE JAEGHER, G., N. BOYER & T. GASPAR (1985). Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: changes in soluble and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. *Pl. Growth Regul.* 3: 133-148.

- FERGUSON, I. & B. DROBAK (1988). Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *Hort. Sci.* 23: 262-266.
- GALAUD, J.-P., T. GASPARD & N. BOYER (1993a). Inhibition of internodes growth due to mechanical stress in *Bryonia dioica*: relationship between changes in DNA methylation and ethylene metabolism. *Physiol. Pl.* 87: 25-30.
- GALAUD, J.-P., T. GASPARD & N. BOYER (1993b). Effect of anti-DNA methylation drugs on growth, level of methylated DNA, peroxidase activity and ethylene production of *Bryonia dioica* internodes. *Physiol. Pl.* 87: 528-534.
- JAFFE, M. (1973). Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation with special reference to *Bryonia dioica*. *Planta* 114: 143-157.
- KUROSAKI, F., Y. TSURUSAWA & A. NISHI (1987). Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Pl. physiol.* 85: 601-604.
- LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 216: 680-685.
- LESHEM, Y., (1987). Membrane phospholipid catabolism and Ca²⁺ activity in the control of senescence. *Physiol. Pl.* 69: 551-559.
- MATHIEU, C., C. MOTTA, M.-A. HARTMANN, C. THONAT & N. BOYER (1995). Changes in plasma membrane fluidity of *Bryonia dioica* internodes during thigmomorphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 249-255.
- MELANSON, D. & A. TREWAVAS (1982). Changes in tissue protein pattern in relation to auxin induction of DNA synthesis. *Pl. Cell Environ.* 5: 53-64.
- MORSE, M., R. CRAIN & R. SATTER (1987). Light stimulated inositolphospholipid turnover in *Samanea saman* leaf pulvini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7075-7078.
- MURRAY, M. & J. KEY (1978). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-enhanced phosphorylation of soybean nuclear proteins. *Pl. Physiol.* 61: 190-198.
- RANJEVA, R. & A.-M. BOUDET (1987). Phosphorylation of proteins in plants: Regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 38: 73-93.
- RANJEVA, R., A. CARRASCO & A.-M. BOUDET (1988). Inositol triphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cells. *FEBS Lett.* 230: 137-141.
- STRATTON, B. & A. TREWAVAS (1981). Phosphorylation of histone H1 during the cell cycle of artichoke. *Pl. Cell Environ.* 4: 419-426.
- SUZUKI, H. & D. VERMA D. (1990). Nodule specific kinases phosphorylating nuclear factors in isolated nuclei. *Pl. Cell* 1: 373-379.
- THONAT, C., N. BOYER, C. PENEL, J.-C. COURDUROUX & T. GASPARD (1993). Cytological indication of the involvement of calcium and calcium-related proteins in the early responses of *Bryonia dioica* to mechanical stimulus. *Protoplasma* 176: 133-137.
- VAN LOON, L., A. TREWAVAS & K. CHAPMAN (1975). Phosphorylation of chromatin-associated proteins in *Lemna* and *Hordeum*. *Pl. Physiol.* 55: 288-292.
- WIEGLAT, B. & K. KLECZKOWSKI (1981). Gibberellic acid enhanced phosphorylation of pea chromatin proteins. *Pl. Sci. Lett.* 21: 381-388.

Adresses des auteurs: T.D.: Laboratoire de physiologie végétale, Université de Genève, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève.

C.T. et N.B.: Laboratoire de physiologie et génétique végétales, U.A. Physiologie intégrée de l'arbre fruitier, INRA-Université Blaise-Pascal, 4, rue Ledru, F-63038 Clermont-Ferrand Cedex.

