

IMMUNOLOCALISATION D'UNE GLYCOSYLTRANSFERASE GOLGIENNE FUSIONNEE A LA GFP DANS DES CELLULES VEGETALES

Follet-Gueye Marie-Laure, Pagny Sophie, Faye Loïc, Gomord Véronique et Driouich Azeddine

UMR CNRS 6037-IFRMP 23- Centre Commun de Microscopie Electronique.
Université de Rouen – 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France
marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

Dans la cellule végétale, le système endomembranaire de sécrétion, constitué du reticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi et des vésicules, est impliqué dans l'assemblage, la maturation, le tri et le transport des glycoprotéines et des polysaccharides pariétaux non cellulotiques. L'ensemble de ces fonctions est assuré par une panoplie de protéines dont les chaperonnes du RE et les glycosyltransférases golgiennes.

La caractérisation de ces protéines fait appel aux techniques de génétique moléculaire (clonage, mutagenèse dirigée) réalisées chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabaccum* (suspensions cellulaires Bright Yellow 2, BY2). Ce dernier modèle végétal est de plus en plus utilisé pour étudier l'expression de protéines recombinantes.

La localisation de ces protéines est réalisée par fusion des molécules d'intérêt à des protéines reporters telle que la Green Fluorescent Protein (GFP). La plupart des travaux concernent l'observation dynamique des protéines recombinantes dans des cellules BY2 vivantes en microscopie confocale laser. Leur localisation fine à l'échelle intra-compartimentale n'est possible qu'en microscopie électronique à transmission (MET) *via* les techniques immunocytochimiques. A ce jour, peu de résultats [1, 2 et 3] ont été publiés concernant cette approche microscopique qui se pratique obligatoirement sur des cellules fixées, déshydratées et incluses dans une résine. La fixation doit assurer une bonne préservation du système endomembranaire et permettre l'immunodétection des protéines recombinantes dans ces compartiments.

Nous présentons ici une technique de fixation chimique des cellules BY2 mise au point dans notre laboratoire et adaptée à l'immunolocalisation des glycosyltransférases golgiennes fusionnées à la GFP [4]. Cette technique nous a permis de localiser une xylosyltransférase golgienne impliquée dans la maturation des N-glycannes par l'utilisation d'anticorps spécifiques de la GFP produits au laboratoire. Cette technique est également applicable à l'immunolocalisation intra-Golgi des glycosyltransférases impliquées dans l'assemblage des polysaccharides complexes de la paroi, tels les pectines ou les xyloglucanes.

[1] Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S, Martin, B., Hawes, C. *Plant J.*, **15** (1998) 441-447.

[2] Nebenführ, A., Gallagher, LA., Dunahay, TG, Frohlick, JA., Mazurkiewicz, AM., Meehl, JB., Staehelin LA, *Plant Physiol.*, **121** (1999) 1127-1141.

[3] Pagny,S., Bouissonié, F., Sarkar, M., Follet-Gueye, ML., Driouich, A., H., Faye, L., Gomord, V., *Plant J*, **33** (2003) 189-203.

[4] Follet-Gueye, ML., Pagny, S., Faye, L., Gomord, V., Driouich, A., *J.Histochem and Cytochem.*, **51** (2003). Issue de juillet.